

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/006439

International filing date: 25 March 2005 (25.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-093219  
Filing date: 26 March 2004 (26.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

14. 4. 2005

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 4 年    3 月 2 6 日  
Date of Application:

出 願 番 号                      特 願 2 0 0 4 - 0 9 3 2 1 9  
Application Number:

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号

The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

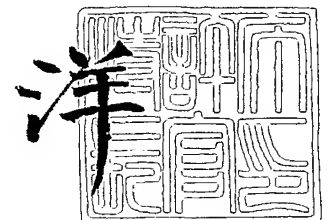
J P 2 0 0 4 - 0 9 3 2 1 9

出      願      人                      大正製薬株式会社  
Applicant(s):

2 0 0 5 年    4 月    5 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 DA-03637  
【提出日】 平成16年 3月26日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C07H 11/00  
A61K 31/70

【発明者】  
【住所又は居所】 鳥取県鳥取市湖山町北3-251 RCK6-403  
【氏名】 田村 純一

【特許出願人】  
【識別番号】 000002819  
【氏名又は名称】 大正製薬株式会社

【代理人】  
【識別番号】 100066692  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 浅村 皓

【選任した代理人】  
【識別番号】 100072040  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 浅村 肇

【選任した代理人】  
【識別番号】 100088926  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 長沼 暉夫

【選任した代理人】  
【識別番号】 100102897  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 池田 幸弘

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 002901  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

## 【書類名】 特許請求の範囲

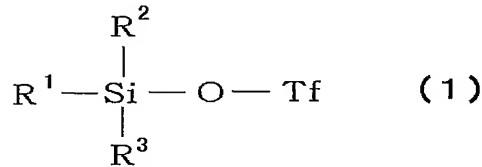
## 【請求項 1】

(A) 還元末端のグリコシル化に付する水酸基に脱離基が付与され、その他の水酸基及びカルボキシル基が保護されているグルクロン酸又はイズロン酸の誘導体を還元末端に持つ、糖供与体を、

非還元末端のグリコシル化に付する水酸基がフリーであり、その他の水酸基が保護されている N-アシルガラクトサミン誘導体を還元末端に持つ糖受容体と、

下記一般式 (1) で示すプロモーターの存在下でグリコシル化反応させる工程を含むことを特徴とする、オリゴグリコサミノグリカンの製造方法：

## 【化 1】



[上記一般式 (1) 中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$  及び  $\text{R}^3$  は、それぞれ独立して、置換されていないか少なくとも一部の H が置換されている直鎖若しくは分岐鎖のアルキル基または芳香族基を示し、Tf は、トリフルオロメタンスルフォニル基を示す。]

## 【請求項 2】

(A) 前記糖供与体が、グルクロン酸又はイズロン酸の誘導体であって、還元末端のグリコシル化に付する水酸基に脱離基が付与され、その他の水酸基及びカルボキシル基が保護されている単糖体、或いは N-アシルガラクトサミン誘導体とグルクロン酸又はイズロン酸の誘導体とからなり、還元末端のグリコシル化に付する水酸基に脱離基が付与され、その他の水酸基及びカルボキシル基が保護されている 2 糖体であり、

前記糖受容体が、N-アシルガラクトサミン誘導体とグルクロン酸又はイズロン酸の誘導体とからなり、非還元末端のグリコシル化に付する水酸基がフリーであり、その他の水酸基及びカルボキシル基が保護されている、2 糖体である、

請求項 1 に記載のオリゴグリコサミノグリカンの製造方法：

## 【請求項 3】

前記 (A) の工程の後、更に

(B) 前記 (A) の工程で得られたオリゴ糖の非還元末端における一の保護基を脱離し、

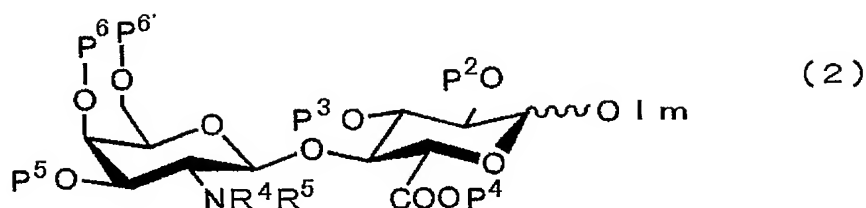
(C) 該一の保護基を脱離したオリゴ糖を、前記プロモーターの存在下、前記糖供与体と、グリコシル化反応させる工程を、

1 から 8 回の任意の回数繰り返して行なう、請求項 1 又は 2 に記載の製造方法。

## 【請求項 4】

前記糖供与体として、下記一般式 (2) で示す還元末端グルクロン酸型コンドロイチン誘導体を用い；

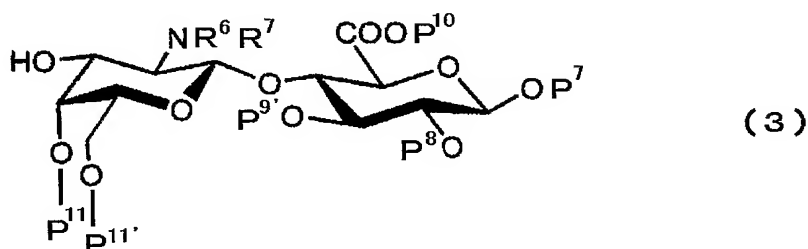
## 【化2】



「上記一般式(2)中、 $R^4$ は、同一又はそれぞれ独立して、水素原子、アルキル基、アリル基、アシル基及びフタロイル基から基なる群より選択され、 $Im$ は、イミドイル基、ハロゲン原子、メチルチオ基、フェニルチオ基等のアルキルチオ基、スルホニル基及びスルフィニル基からなる群から選択される脱離基であり、 $P^2$ 及び $P^3$ は、水素原子、アルキル基、アリル基、アラルキル基、アリール基及びシリル基からなる群から選択され、 $P^4$ は、アルキル基、アリル基及びアラルキル基からなる群から選択され、 $P^5$ は、アリル基、アシル基、アラルキル基及びシリル基からなる群から選択され、 $P^6$ 及び $P^{6'}$ は、水素原子、アルキル基、アリル基、アラルキル基、アリール基、シリル基及びアルキリデン基からなる群から選択される。」

前記糖受容体として、下記一般式(3)で示す還元末端グルクロン酸型コンドロイチン誘導体を用いる、請求項1～3の何れか1項に記載の製造方法：

## 【化3】



「上記一般式(3)中、 $R^5$ は、同一又はそれぞれ独立して、水素原子、アルキル基、アリル基、アシル基及びフタロイル基からなる群より選択され、 $P^7$ は、アルキル基、アラルキル基、アリル基及びアリール基からなる群から選択され、 $P^8$ 及び $P^9$ は、水素原子、アルキル基、アリル基、アラルキル基、アリール基及びシリル基からなる群から選択され、 $P^{10}$ は、アルキル基、アリル基及びアラルキル基からなる群から選択され、 $P^{11}$ 及び $P^{11'}$ は、水素原子、アルキル基、アリル基、アラルキル基、アリール基、シリル基及びアルキリデン基からなる群から選択され、両者間を架橋するものを含む。」

## 【請求項5】

前記一般式(1)中、 $R^1$ 、 $R^2$ 及び $R^3$ が、それぞれ独立して、Hであるか、直鎖若しくは分岐鎖のアルキル基である、請求項1～4の何れか1項に記載の製造方法。

## 【請求項6】

前記プロモーターが、トリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル(TMSOTf)である、請求項3～5の何れか1項に記載の製造方法。

## 【請求項7】

前記(B)及び(C)の工程を1～5回繰り返す、請求項1～6の何れか1項に記載の製造方法。

## 【請求項8】

(D-1)更に、前記(A)又は(C)の工程で得られたオリゴ糖誘導体の全保護基を脱

離させる工程を含む、請求項 1～7 の何れか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 9】

(D-2) 更に、前記 (A) 又は (C) の工程で得られたオリゴ糖の全保護基を脱離させるとともに、各 N-アシルガラクトサミンにおける 4 位及び 6 位を選択的に硫酸化する工程を含む、請求項 1～7 の何れか 1 項に記載の製造方法。

【請求項 10】

糖供与体及び糖受容体として、前記一般式 (2) 及び (3) に記載の還元末端グルクロン酸型コンドロイチン誘導体を用い、

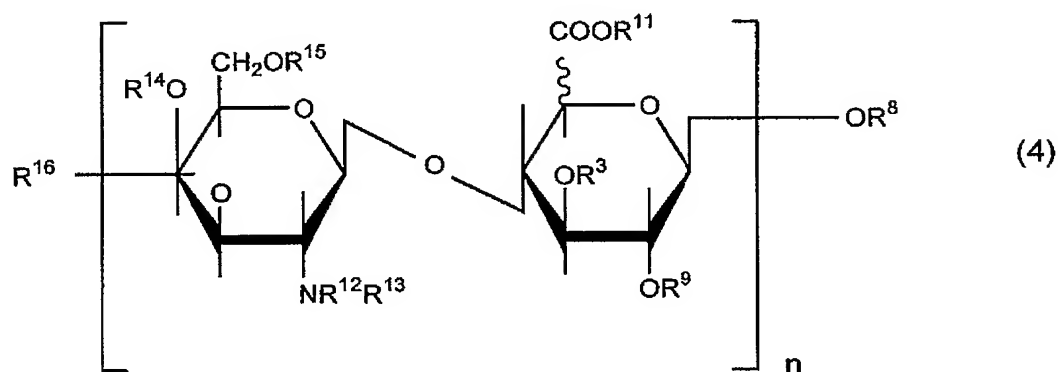
前記 (A) 又は (C) の工程で得られたオリゴ糖の非還元末端のある N-アシルガラクトサミンの 4 位及び 6 位以外の水酸基をピバロイル基で置換した後、各 N-アシルガラクトサミンの 4 位及び 6 位を保護するベンジリデン基、アルコキシベンジリデン基又はシクロヘキシリデン基を脱離し、

次いで、該脱保護したオリゴ糖を硫酸化することにより、各 N-アシルガラクトサミンにおける 4 位及び 6 位を選択的に硫酸化する、請求項 9 に記載の製造方法。

【請求項 11】

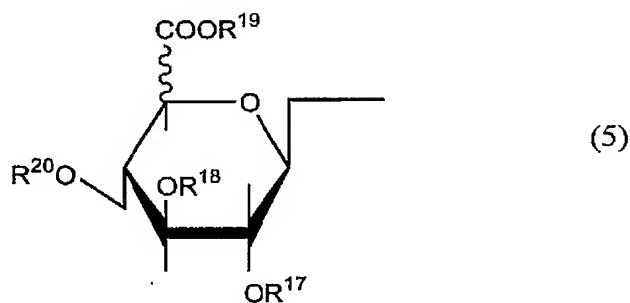
下記一般式 (4) で表される、還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン若しくは還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン硫酸、またはそれらの塩若しくは誘導体：

【化 4】



[上記一般式 (4) 中、 $R^8$  は、水素原子または保護基を示し、 $R^9 \sim R^{11}$  は、同一又はそれぞれ独立して、水素原子又は保護基であり、 $R^{12}$  及び  $R^{13}$  は、同一又はそれぞれ独立して、水素原子、アルキル基、アシル基、アシル基及びフタロイル基からなる群から選ばれ、 $R^{14}$  及び  $R^{15}$  は、それぞれ独立して、水素原子、或いは硫酸基若しくはリン酸基又はこれらのナトリウム、カリウム、銅、カルシウム、鉄、マンガン、亜鉛、アンモニウム、バリウム及びリチウムからなる群から選択される塩を示し、 $R^{16}$  は、水素原子、又は下記一般式 (5) に示すグルクロン酸誘導体若しくはイズロン酸誘導体を示す。また、上記一般式 (4) 中、 $n$  は、3～10 の整数である。]

## 【化 5】



〔上記一般式(5)中、R<sup>17</sup>、R<sup>18</sup>及びR<sup>19</sup>は、それぞれ独立して、同一又はそれぞれ独立して、水素原子又は保護基、或いはナトリウム、カリウム、銅、カルシウム、鉄、マンガ、亜鉛、アンモニウム、バリウム又はリチウムを示し、R<sup>20</sup>は、水素原子または保護基を示す。〕

## 【請求項 12】

前記一般式(4)において、R<sup>14</sup>及びR<sup>15</sup>が硫酸基である、請求項12に記載の還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン硫酸、またはその塩若しくは誘導体。

## 【請求項 13】

前記一般式(4)において、nが3～6である請求項12又は13に記載の還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン若しくは還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン硫酸、またはそれらの塩若しくは誘導体。

## 【請求項 14】

請求項11～13の何れかに記載の還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン若しくは還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン硫酸、またはそれらの塩若しくは誘導体の少なくとも一種と、製剤上許容される担体とを含有する、医薬組成物。

## 【請求項 15】

CD44分子によって誘発される疾患または症状を、改善、治療または予防するための、請求項14に記載の医薬組成物。

## 【請求項 16】

自己免疫疾患、関節炎、アレルギー性疾患又は癌を治療するため、或いは免疫を調節、細胞分化の誘導又は細胞アポトーシスを誘導するために用いられる請求項15に記載の医薬組成物。

## 【請求項 17】

CD44分子の作用によって誘発される疾患または症状を、改善、治療または予防する医薬組成物の製造のための、請求項11～13に記載の還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン若しくは還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン硫酸、またはそれらの塩若しくは誘導体の使用。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】オリゴグリコサミノグリカンの製造方法、並びに還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン硫酸、及びこれを含む医薬組成物

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、4以上、特に6以上の構成糖からなるオリゴグリコサミノグリカンを効率的に製造する化学的な製造方法に関する。また本発明は、CD44分子の関与により誘発する症状若しくは疾患の改善、治療及び予防に有用な、6糖以上の構成糖からなる還元末端グルクロン酸型コンドロイチン硫酸オリゴ糖及びこれを含む医薬組成物に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

グリコサミノグリカンは、ウロン酸（誘導体）またはガラクトース（誘導体）とヘキソサミン（誘導体）とからなる基本2糖単位の繰り返し構造を持つ多糖である。グリコサミノグリカンは、生体内では、その基本2糖単位が約40から100回繰り返される非常に長い糖鎖を形成し、その多くはプロテオグリカン中のコア蛋白に共有結合して存在する。

## 【0003】

グリコサミノグリカンに属するものとしては、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ケラタン硫酸などが知られ、コンドロイチン硫酸ではグルクロン酸（誘導体）とN-アシルガラクトサミン（誘導体）、デルマタン硫酸ではイズロン酸（誘導体）とN-アシルガラクトサミン（誘導体）、ケラタン硫酸では、ガラクトース（誘導体）とN-アシルガラクトサミン（誘導体）が、それぞれ基本2糖単位を構成する。

## 【0004】

近年、これらグリコサミノグリカンの細胞認識機能に高い関心が寄せられており、各種細胞において発現している各グリコサミノグリカンを含む糖鎖が細胞外成分との相互作用を介して種々の生理的機能に関与することが明らかとなっている。

## 【0005】

例えば、特許文献1では、イズロン酸と硫酸化アセチルガラクトサミンの2糖を繰り返し単位とする16～100糖単位からなるデルマタン硫酸が、トロンビン生成及び補体活性化の阻害剤として有用であることが開示されている。また、非特許文献1では、ハツカネズミの関節リュウマチモデルにおいて、生体中に存在するヒアルロン酸が、様々な細胞機能に関与することが知られているCD44抗原と相互作用し、特定の抗体によりヒアルロン酸のCD44への結合を阻害すると、関節リュウマチの症状が軽減されることが開示されている。

## 【0006】

更に、最近の研究では、生体から採取した長鎖のグリコサミノグリカンを切断して得られる、オリゴグリコサミノグリカン（以下、本明細書で「オリゴ」とは、2～20個の構成糖からなることを意味する。）であっても、細胞外成分と相互作用して、生理的機能に関与することが示唆若しくは指摘されている。

## 【0007】

例えば、非特許文献2には、4の構成糖からなるコンドロイチン硫酸Eは、L-セクレチン及びP-セクレチンと相互作用することが開示されている。但し、同文献では、硫酸化が一部若しくは全くなされていない対応コンドロイチンファミリーでは、L-セクレチン及びP-セクレチンと相互作用しないことが開示されている。さらに、同文献は、2の構成糖からなるグリコサミノグリカンとCD44との相互作用についても開示しており、2の構成糖からなるコンドロイチン、デルマタン及びヒアルロン酸が、その硫酸化とは無関係にCD44と相互作用すること、即ち、CD44との相互作用においては、糖鎖上の硫酸基が寄与しないことを指摘している。

## 【0008】

但し、同文献は、プラズモン共鳴アッセイにより各オリゴグリコサミノグリカンとCD44との相互作用を分析したものであり、実際の生理的機能については何ら実証されてい



ない。

#### 【0009】

この点、特許文献2には、硫酸化アセチルグルコサミンを還元末端に有する2～5の構成糖からなるオリゴケラタン硫酸が、抗炎症剤、抗アレルギー剤、免疫調整剤、細胞の分化誘導剤、及びアポトーシス誘導剤として有用であることが開示されている。

#### 【0010】

また、特許文献3には、D-ガラクトサミン誘導体とD-グルクロン酸誘導体とを基本2糖単位とする2～8の構成糖からなるオリゴコンドロイチンが、抗アレルギー作用、抗炎症作用及びヒアルロニダーゼ阻害作用を有することが記載されている。

#### 【0011】

但し、この特許文献では、開示されている製造工程が単糖からなる糖供与体を逐次グリコシル結合させる工程であることから明らかな様に、実際に4糖以上のオリゴ糖を製造されたとの記載はなく、勿論、薬理学的活性については実証されているのは、2の構成糖からなるコンドロイチンのみである。

#### 【0012】

また、非特許文献3では、6～14の構成糖からなる各鎖長のオリゴヒアルロン酸を含むオリゴマー混合物が、CD44の分解を誘発し、その一方で、1000以上の構成糖からなるヒアルロン酸、更には、2の構成糖からなるヒアルロン酸では、CD44分解を誘発しないことが指摘されている。

#### 【0013】

ところで、オリゴグリコサミノグリカンの機能に対する関心が高まるにつれ、特定の鎖長、硫酸化等の修飾基の付加、及び立体構造を有するオリゴグリコサミノグリカンを選択的に製造する方法に対する要求が強まってきている。

#### 【0014】

従来、オリゴグリコサミノグリカンを得る方法の1つとして、生体から採取した長鎖のグリコサミノグリカン、分解酵素を用いて切断する方法が知られている（特許文献2及び4）。

#### 【0015】

しかし、この酵素法による製造方法では、医薬製造へ適用する際に、他の生体成分の混入による副作用が問題と成り易い。また、この酵素による方法では、任意の鎖長のグリコサミノグリカンを得ることができず、実際に得られるものは殆ど2の構成糖からなるものであった。また、修飾基、及び立体構造は、基本的に生体内から採取される酵素処理前のグリコサミノグリカンによって確定されるという制限もあった。

#### 【0016】

他方、不純物の混入がなく、任意の鎖長、修飾基の付加、及び立体構造のグリコサミノグリカンを得る方法として、化学的な合成方法が注目されている。

例えば、前記特許文献3には、単糖であるD-ガラクトサミン誘導体とD-グルクロン酸誘導体とを、逐次グリコシル結合して、これら2糖単位の繰り返しからなる2～8オリゴ糖を製造する方法が開示されている。

#### 【0017】

しかし、この方法は、単糖を逐次結合させる度に保護基による保護及びその離脱の工程を要するにも拘らず、4以上の構成糖からなるグリコサミノグリカンを高収率で得るための配慮は何らなされていない。実際、同文献には、4糖以上の構成糖からなるグリコサミノグリカン製造した例は記載されていない。また、特定の位置の水酸基を選択的に硫酸化する方法についても開示されていない。

#### 【0018】

これに対して、本発明者らは、アジド化した2の構成糖からなる糖供与体を、同じくアジド化した2の構成糖からなる糖受容体と、ルイス酸である $\text{BF}_3\text{OEt}_2$ の存在下で反応させることで、還元末端グルクロン酸型4糖コンドロイチン硫酸を得る方法を提案している（非特許文献4及び6）。

## 【0019】

この方法は、上記特許文献1に記載の方法における問題を解決し、還元末端グルクロン酸型4糖コンドロイチン硫酸を50%の収率で得られるものである。

もっとも、非特許文献4及び6に記載の製造方法では、6以上の構成糖からなるアセチルガラクトサミンを合成する場合、アジド基をアセトアミド基に変換できず、6以上の構成糖からなる還元末端グルクロン酸型コンドロイチン硫酸を合成することができなかった。

## 【0020】

また、非特許文献5には、グリコサミノグリカンの任意の水酸基を選択的に硫酸化する方法が開示されているが、同文献の方法は、N-アシルガラクトサミンの4位又は6位の何れかを硫酸化する方法であり、4位及び6位の両方を選択的に硫酸化できるものではなかった。

【特許文献1】特表2003-512807号

【特許文献2】WO96/16973

【特許文献3】特開平5-178876号

【特許文献4】特開平5-058716号

【非特許文献1】ARTHRITIS & RHEUMATISM Vol.42, No.4, 1999, pp.659-668

【非特許文献2】THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol.277, No.15, pp.12921-12930, 2002

【非特許文献3】THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol.278, No.34, pp.32259-32265, 2003

【非特許文献4】Carbohydrate Research 305 (1998) 43-63

【非特許文献5】Carbohydrate Research 326 (2000) 88-97

【非特許文献6】Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol.5, No.13, pp.1351-1354, 1995

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0021】

本発明は、上述の従来技術の問題に鑑みてなされたものであり、4以上、特に6以上の構成糖からなる任意の鎖長及び構造のオリゴグリコサミノグリカン、高収率、高純度で製造できる方法を提供することを目的とする。また本発明は、この本発明の製造方法により初めて得られる、6以上の任意の数の構成糖からなる高純度の還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン硫酸及びこれを含む医薬組成物を提供することを目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0022】

本発明者らは、上記課題を解決すべく、非特許文献4に記載の製造方法について検討したところ、アセトアミド化した構成糖からなる糖供与体及び糖受容体を用い、更に、プロモーターとして、トリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル及びその類似化合物を用いることで、4以上の構成糖からなる任意の鎖長のオリゴグリコサミノグリカン、高収率、高純度で製造し得ることを見出し、本発明を完成した。

## 【0023】

即ち、本発明は、(A)還元末端のグリコシル化に付する水酸基に脱離基が付与され、その他の水酸基及びカルボキシ基が保護されているグルクロン酸又はイズロン酸の誘導体を末端に持つ、糖供与体を、非還元末端のグリコシル化に付する水酸基がフリーであり、その他の水酸基が保護されているN-アシルガラクトサミン誘導体を末端に有する糖受容体と、前記一般式(1)で示すプロモーターの存在下でグリコシル化反応させる工程を含むことを特徴とする、オリゴグリコサミノグリカンの製造方法を提供するものである。

また、本発明は、好適な一実施形態において、(A)グルクロン酸又はイズロン酸の誘導体であり、還元末端のグリコシル化に付する水酸基に脱離基が付与され、その他の水酸基及びカルボキシ基が保護されている単糖体、或いはN-アシルガラクトサミン誘導体

とグルクロン酸又はイズロン酸の誘導体とからなり、還元末端のグリコシル化に付する水酸基に脱離基が付与され、その他の水酸基及びカルボキシル基が保護されている2糖体から選ばれる、糖供与体を；N-アシルガラクトサミン誘導体とグルクロン酸又はイズロン酸の誘導体とからなり、非還元末端のグリコシル化に付する水酸基がフリーであり、その他の水酸基及びカルボキシル基が保護されている、糖受容体と；前記一般式(1)に示すプロモーターの存在下でグリコシル化反応させる工程を含むことを特徴とする、オリゴグリコサミノグリカンの製造方法が提供される。

#### 【0024】

本発明の製造方法は、5以上の構成糖からなるオリゴグリコサミノグリカンを製造する場合には、上記工程に加え、(B)前記(A)の工程で得られたオリゴ糖の非還元末端における一の保護基を脱離し、(C)当該一の保護基を脱離したオリゴ糖を、前記プロモーターの存在下、前記糖供与体、好ましくは2の構成糖からなる前記糖供与体と、グリコシル化反応させる工程を含む。また、(D)当該(B)及び(C)の工程を、1から8回の任意の回数繰り返すことで、5以上の構成糖からなる任意の鎖長のオリゴグリコサミノグリカンを製造することができる。もっとも、高収率化の点では、当該(B)及び(C)の工程を1～5回繰り返すことで、任意の鎖長のオリゴグリコサミノグリカンを製造することが好ましい。

#### 【0025】

本発明の製造方法では、目的とするオリゴグリコサミノグリカンに応じて前記糖供与体及び糖供与体を選択すればよく、例えば、還元末端グルクロン酸型オリゴグリコサミノグリカン又はその誘導体を製造する場合には、糖供与体として、全水酸基が保護されているN-アシルガラクトサミン誘導体と、グリコシル化に付する位置の水酸基に脱離基が付与され、その他の水酸基及びカルボキシル基が保護されている、グルクロン酸又はイズロン酸とからなるものを用いることができる。より具体的には、オリゴコンドロイチン又はその誘導体を製造する場合の例として、前記一般式(2)で示す2の構成糖からなる還元末端グルクロン酸型コンドロイチン誘導体を挙げるができる。

#### 【0026】

同様に、還元末端グルクロン酸型オリゴグリコサミノグリカン又はその誘導体を製造する場合には、糖受容体として、グリコシル化に付する水酸基がフリーであり、その他の水酸基が保護されている、N-アシルガラクトサミン誘導体と、全水酸基及びカルボキシル基が保護されている、グルクロン酸又はイズロン酸とからなるものを用いることができる。より具体的には、オリゴコンドロイチン又はその誘導体を製造する場合の例として、前記一般式(3)で示す2の構成糖からなる還元末端グルクロン酸型コンドロイチン誘導体を挙げるができる。

#### 【0027】

また、本発明で用いられるプロモーターは、前記一般式(1)中、 $R^1$ 、 $R^2$ 及び $R^3$ が、それぞれ独立して、Hであるか、直鎖若しくは分岐鎖のアルキル基であるものが好ましく、例えばトリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル(TMSOTf)等、当該アルキル基の炭素数が5以下のものが特に好ましい。

#### 【0028】

また、本発明の製造方法は、通常、前記(A)又は(C)工程で得られたオリゴ糖の全保護基を脱離させる工程を含む。また、目的に応じて、前記(A)又は(C)工程で得られたオリゴ糖の全保護基を脱離させるとともに、各N-アセチルグルコサミンの4位及び/又は6位を選択的に硫酸化する工程を含ませることもできる。

#### 【0029】

本発明においては、前記(A)又は(C)工程で得られたオリゴ糖の各N-アシルガラクトサミンにおける4位及び6位の水酸基をベンジリデン基、アルコキシベンジリデン基又はシクロヘキシリデン基で保護し、さらに、当該オリゴ糖の非還元末端の構成糖における4位及び6位以外の水酸基をピバロイル基で保護した後、当該4位及び6位の水酸基を保護させたベンジリデン基、アルコキシベンジリデン基又はシクロヘキシリデン基を脱

離し、次いで、脱保護された当該4位及び6位の水酸基を硫酸化することにより、各N-アシルガラクトサミンにおける4位及び6位を選択的に硫酸化することができる。

#### 【0030】

本発明はまた、上記本発明の製造方法により得られる、新規の還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン、還元末端イズロン酸型オリゴコンドロイチン、還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン又は硫酸還元末端イズロン酸型オリゴコンドロイチン硫酸、或いはそれらの塩又は誘導体（以下、「還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン（硫酸）等」と略記することがある。）、具体的には、前記一般式（4）で表わされる、還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン（硫酸）等を提供するものである。

#### 【0031】

本発明の還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン（硫酸）等においては、CD44に対するシェディング誘導能の点で、前記一般式（4）中、少なくとも $R^7$ 及び $R^8$ の何れか1つが硫酸基であるものが好ましく、 $R^7$ 及び $R^8$ が硫酸基であるものが特に好ましい。また、本発明の還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン（硫酸）等は、効率的な生産及びCD44に対するシェディング誘導能の点で、一般式（4）中、 $n$ が3～6であるものが好ましい。

#### 【0032】

また、本発明の還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン（硫酸）等は、生体成分である脂質、蛋白等の不純物は全く含有していない。

#### 【0033】

本発明の還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン（硫酸）等は、CD44に対するシェディング誘導能に関し高い活性を有し、CD44分子によって誘発される疾患または症状を、改善、治療または予防するための活性成分として使用することができる。

#### 【0034】

かくして、本発明は、本発明の還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン（硫酸）等と、製剤上許容される担体とを含有する、CD44分子によって誘発される疾患または症状を、改善、治療または予防するための、医薬組成物も提供するものである。

#### 【0035】

また、本発明によれば、CD44分子の作用によって誘発される疾患または症状を、改善、治療または予防する医薬組成物の製造のための、本発明の還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン（硫酸）等の使用も提供される。

#### 【0036】

更に、本発明によれば、本発明の還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン（硫酸）等を用いて、CD44分子の作用によって誘発される疾患または症状を、改善、治療または予防する方法が提供される。

#### 【0037】

（本発明の詳細な説明）

本発明の製造方法は、（A）還元末端のグリコシル化に付する水酸基に脱離基が付与され、その他の水酸基及びカルボキシ基が保護されているグルクロン酸又はイズロン酸の誘導体を末端に持つ、糖供与体を、非還元末端のグリコシル化に付する水酸基がフリーであり、その他の水酸基が保護されているN-アシルガラクトサミン誘導体を末端に持つ、糖受容体と、特定のルイス酸タイプのプロモーターの存在下でグリコシル化反応させる工程を含むものである。

また、本発明の製造方法は、好適な実施の形態において、（A）グルクロン酸又はイズロン酸の誘導体であり、還元末端のグリコシル化に付する水酸基に脱離基が付与され、その他の水酸基及びカルボキシ基が保護されている単糖体、或いはN-アシルガラクトサミン誘導体とグルクロン酸又はイズロン酸の誘導体とからなり、還元末端のグリコシル化に付する水酸基に脱離基が付与され、その他の水酸基及びカルボキシ基が保護されている2糖体から選ばれる、糖供与体を；N-アシルガラクトサミン誘導体とグルクロン酸又はイズロン酸とからなり、非還元末端のグリコシル化に付する水酸基がフリーであり、そ

の他の水酸基及びカルボキシル基が保護されている、糖受容体と；特定のルイス酸タイプのプロモーターの存在下でグリコシル化反応させる工程を含むものである。

#### 【0038】

また、本発明の製造方法は、6以上の構成糖からなるオリゴグリコサミノグリカンを製造する場合、更に（B）前記（A）の工程で得られたオリゴ糖の非還元末端における一の保護基を脱離し、（C）非還元末端にフリーの水酸基を持つオリゴ糖を、前記プロモーターの存在下、前記糖供与体とグリコシル化反応させる工程を、1から8回の任意の回数繰り返すものである。

#### 【0039】

以下、本発明の一の態様における反応スキームを示す図1～5を参照しながら、各工程について具体的に説明する。なお、図1～5は、代表的な例として、後述する6の構成糖からなる還元末端グルクロン酸型コンドロイチン硫酸を得る場合の反応スキームを示すものである。従って、本発明は、これらの図面によって何ら制限されるものではなく、他のオリゴグリコサミノグリカンを製造する場合には、目的とするオリゴグリコサミノグリカンに応じて、適宜、対応する糖供与体、糖受容体及び保護基が選択されるものと理解されるべきである。

#### 【0040】

（A）アセトアミド化した2の構成糖からなる糖供与体と糖受容体とのグリコシル化

#### 【0041】

（A-1）糖供与体

本発明で用いられる糖供与体は、還元末端のグリコシル化に付する水酸基に脱離基が付与され、その他の水酸基及びカルボキシル基が保護されているグルクロン酸又はイズロン酸の誘導体を末端に有するものであればよいが、N-アシルガラクトサミン誘導体とグルクロン酸又はイズロン酸とからなり、還元末端のグリコシル化に付する水酸基に脱離基が付与され、その他の水酸基及びカルボキシル基が保護されているものが好ましい。

#### 【0042】

このようなアセトアミド化した構成糖からなる糖供与体を用いることで、4糖以上に伸長させた時点でアセトアミド化することに起因する低収率の問題を回避することができる。

#### 【0043】

本発明で用いられる糖供与体は、その他の点では特に制限はなく、目的とするオリゴグリコサミノグリカンの種類に応じて選択すればよい。

#### 【0044】

例えば、オリゴコンドロイチン硫酸であれば、糖供与体は、還元末端の構成糖においてグリコシル化に付するための水酸基がイミデート化されており、その他の水酸基及びカルボキシル基が保護されている、N-アシルガラクトサミン誘導体とグルクロン酸誘導体からなるものである。

#### 【0045】

同様に、デルマタン硫酸であれば、糖受容体は、非還元末端の構成糖においてグリコシル化に付するための水酸基がイミデート化されており、その他の水酸基及びカルボキシル基が保護されている、N-アシルガラクトサミン誘導体とイズロン酸誘導体からなるものである。また、ケタラン硫酸であれば、非還元末端の構成糖においてグリコシル化に付するための水酸基がイミデート化されており、その他の水酸基及びカルボキシル基が保護されている、N-アシルガラクトサミン誘導体とガラクトース誘導体からなるものである。

#### 【0046】

なお、還元末端グルクロン酸型のオリゴグリコサミノグリカンを製造する場合には、非還元末端が通常N-アシルガラクトサミン誘導体となる。

#### 【0047】

これら糖供与体の保護基としては、例えば、メチル基、エチル基等のアルキル基、ベンジル基、メチルベンジル基、p-メトキシベンジル基等のアラルキル基、トリフェニルメチル基等のトリフェニルアルキル基、アリル基、ハロゲン、チオメチル基等のチオアルキ

ル基、イソプロピリデン基、ベンジリデン基、p-メトキシベンジリデン基等のアルコキシベンジリデン基、シクロヘキシリデン基、アセチル基、ベンゾイル基、モノクロロアセチル基、アシル基、スルホニル基、シリルエーテル基又はアルケニル基等を挙げることができる。

#### 【0048】

もっとも、本発明においては、グリコシル化反応による伸長、及び選択的な硫酸基等の付加により、所望の構造の化合物が得られるように、その目的化合物に応じて、適宜、保護基、置換基を設計しておく必要がある。

#### 【0049】

例えば、後の追加の糖供与体とのグリコシル化反応に付する位置の保護基は、グリコシル化に先立って所望の位置の保護基のみを脱離できるように、アリル基、アシル基、アラルキル基又はシリル基、好ましくはモノクロロアセチル、p-メトキシベンジル基又はレブリニル基等の保護基で保護することが好ましい。

#### 【0050】

同様に、例えば、各N-アシルガラクトサミンの4位及び6位に、選択的に硫酸化を行なわせるためには、該当位置をベンジリデン基、p-メトキシベンジリデン基等のアルコキシベンジリデン基、又はシクロヘキシリデン基で保護しておくことが好ましい。

#### 【0051】

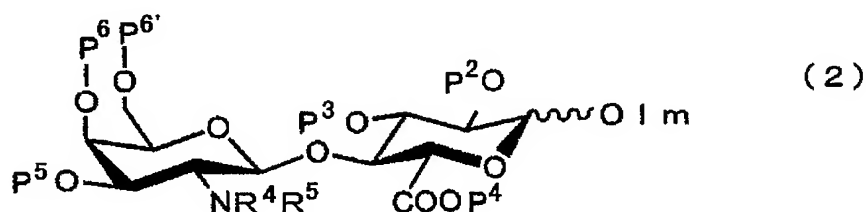
また、製造工程全般に亘って、特定の位置を保護する場合には、メチル基等のアルキル基、ベンジル基、メチルベンジル基等のアラルキル基、トリフェニルメチル基等のアルキル芳香族基、p-メトキシベンジル基等のアルコキシベンジル基、アリル基、ベンゾイル基、アセチル基、又はモノクロロアセチル基が好ましい。なお、これら保護基の形成は、当業者に知られる公知の方法により行なえばよい。

#### 【0052】

ここで、本発明で用いられる糖供与体の代表例として、後述する還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン硫酸を製造する場合に用いられる糖供与体を下記一般式(2)に示す。

#### 【0053】

##### 【化1】



#### 【0054】

一般式(2)中、 $R^4$ は、同一又はそれぞれ独立して、水素原子、アルキル基、アリル基、アシル基及びフタロイル基からなる群より選択され、好ましくはアセチル基、ハロアセチル基、ベンゾイル基及びフタロイル基からなる群より選択される。また、 $I_m$ は、イミドイル基、ハロゲン原子、メチルチオ基及びフェニルチオ基からなる群から選択される脱離基であり、好ましくはトリクロロアセトイミドイル基、トリフルオロアセトイミドイル基及びアセトイミドイル基からなる群から選択される脱離基である。

#### 【0055】

$P^2$ 及び $P^3$ は、水素原子、アルキル基、アリル基、アラルキル基、アリール基及びシリル基からなる群から選択され、好ましくはベンジル基、アルキルベンジル基、トリフェニルアルキル基及びシリル基からなる群から選択される。また、 $P^4$ は、アルキル基、アリル基及びアラルキル基からなる群から選択され、好ましくはベンジル基、アルキルベンジ

ル基及びハロアルキル基からなる群から選択される。

P<sup>5</sup>は、アリル基、アシル基、アラルキル基及びシリル基からなる群から選択され、好ましくはモノクロロアセチル基、p-メトキシベンジル基及びレブリン基からなる群から選択される。また、P<sup>6</sup>は、水素原子、アルキル基、アリル基、アラルキル基、アリール基、シリル基及びアルキリデン基からなる群から選択され、好ましくはベンジル基、ベンジリデン基及びシリル基からなる群から選択される。

#### 【0056】

上記糖供与体の具体的な例としては、メチル(2-アセトアミド-4, 6-O-ベンジリデン-2-デオキシ-3-O-レブリンノイル-β-D-ガラクトピラノシル)-(1->4)-2, 3-ジ-O-(4-メチルベンゾイル)-1-O-トリクロロアセトイミドイル-α-D-グルコピラヌロネート等を挙げることができる。

#### 【0057】

また、このような糖供与体は、非特許文献4に記載の方法により得られる。

#### 【0058】

##### (A-2) 糖受容体

本発明において用いられる糖受容体は、非還元末端のグリコシル化に付する水酸基がフリーであり、その他の水酸基が保護されているN-アシルガラクトサミン誘導体を末端に有するものであればよいが、N-アシルガラクトサミン誘導体とグルクロン酸又はイズロン酸とからなり、非還元末端のグリコシル化に付する水酸基がフリーであり、その他の水酸基及びカルボキシル基が保護されているものが好ましい。

#### 【0059】

糖供与体と同様に、アセトアミド化した2の構成糖からなる糖受容体を用いることで、4糖以上に伸長させた時点でアセトアミド化することに起因する低収率の問題を回避することができる。

#### 【0060】

糖受容体も、その他の点では特に制限はなく、目的とするオリゴグリコサミノグリカンの種類に応じて選択すればよい。

#### 【0061】

例えば、オリゴコンドロイチン硫酸であれば、糖受容体は、非還元末端の構成糖においてグリコシル化に付するための水酸基がフリーであり、その他の水酸基及びカルボキシル基が保護されている、N-アシルガラクトサミン誘導体とグルクロン酸誘導体からなるものである。

#### 【0062】

同様に、デルマタン硫酸であれば、糖受容体は、非還元末端の構成糖においてグリコシル化に付するための水酸基がフリーであり、その他の水酸基及びカルボキシル基が保護されている、N-アシルガラクトサミン誘導体とイズロン酸誘導体からなる。また、ケタラン硫酸であれば、非還元末端の構成糖においてグリコシル化に付するための水酸基がフリーであり、その他の水酸基及びカルボキシル基が保護されている、N-アシルガラクトサミン誘導体とガラクトース誘導体からなるものである。

#### 【0063】

なお、還元末端グルクロン酸型のオリゴグリコサミノグリカンを製造する場合には、還元末端がグルクロン酸誘導体となる。

#### 【0064】

これら糖受容体の保護基としては、例えば、メチル基、エチル基等のアルキル基、ベンジル基等のアラルキル基、トリフェニルメチル基等のトリフェニルアルキル基、アリル基、ハロゲン、チオメチル基等のチオアルキル基、イソプロピリデン基、ベンジリデン基、p-メトキシベンジリデン基等のアルコキシベンジリデン基、シクロヘキシリデン基、アセチル基、ベンゾイル基、モノクロロアセチル基、アシル基、スルホニル基、シリルエーテル基又はアルケニル基等を挙げることができる。

#### 【0065】



もっとも、本発明における糖受容体は、糖供与体と同様に、その目的化合物に応じて、適宜、保護基、置換基を設計しておく必要がある。

【0066】

例えば、還元末端の構成糖におけるアノマー性炭素の位置の水酸基は、p-メトキシフェニル基等のアルコキシ芳香族基で保護基を結合させることが好ましい。

【0067】

同様に、例えば、各N-アシルガラクトサミンの4位及び6位に、選択的に硫酸化を行なわせるためには、該当位置をベンジリデン基、p-メトキシベンジリデン基等のアルコキシベンジリデン基、又はシクロヘキシリデン基で保護しておくことが好ましい。

【0068】

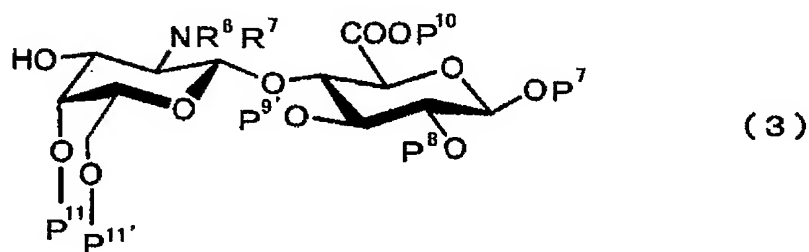
また、製造工程全般に亘って、特定の位置を保護する場合には、メチル基等のアルキル基、ベンジル基、メチルベンジル基等のアラルキル基、トリフェニルメチル基等のアルキル芳香族基、p-メトキシベンジル基等のアルコキシベンジル基、アリル基、ベンゾイル基、アセチル基、又はモノクロロアセチル基が好ましい。なお、これら保護基の形成は、当業者に知られる公知の方法により行なえばよい。

【0069】

ここで、本発明で用いられる糖受容体の代表例として、後述する還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン硫酸を製造する場合の糖受容体を下記一般式(3)に示す。

【0070】

【化2】



【0071】

一般式(3)中、R<sup>5</sup>は、同一又はそれぞれ独立して、水素原子、アルキル基、アリル基、アシル基及びフタロイル基からなる群より選択され、好ましくはアセチル基、ハロアセチル基、ベンゾイル基及びフタロイル基からなる群より選択される。また、P<sup>7</sup>は、アルキル基、アラルキル基、アリル基及びアリアル基からなる群から選択され、好ましくはフェニル基、アルキルフェニル基、アルコキシフェニル基、ベンジル基、アルキルベンジル基、アルコキシベンジル基、ナフチル基及びトリフェニルアルキル基からなる群から選択される。

【0072】

P<sup>8</sup>及びP<sup>9</sup>は、水素原子、アルキル基、アリル基、アラルキル基、アリアル基及びシリル基からなる群から選択され、好ましくはベンジル基、アルキルベンジル基、トリフェニルアルキル基及びシリル基からなる群から選択される。また、P<sup>10</sup>は、アルキル基、アリル基及びアラルキル基からなる群から選択され、好ましくはベンジル基、アルキルベンジル基及びハロアルキル基からなる群から選択される。

【0073】

P<sup>11</sup>及びP<sup>11'</sup>は、水素原子、アルキル基、アリル基、アラルキル基、アリアル基、シリル基及びアルキリデン基からなる群から選択され、好ましくはベンジル基、ベンジリデン基及びシリル基からなる群から選択され、両者間を架橋するものを含む。

【0074】

上記糖受容体の具体的な例としては、メチル(2-アセトアミド-4, 6-O-ベンジリデン-2-デオキシ-β-D-ガラクトピラノシル)-(1→4)-[4-メトキシ



フェニル-2, 3-ジ-*O*-(4-メチルベンゾイル)-*D*-グルコピラノシド] ウロナー  
ート等を挙げることができる。

。

【0075】

また、このような糖受容体は、非特許文献4又は6に記載の方法により得られる。

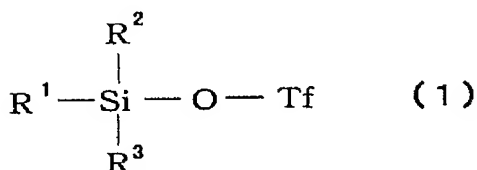
【0076】

(A-3) プロモーター

本発明においては、上記糖供与体を、上記糖受容体と、下記一般式(1)で示すプロモーターの存在下でグリコシル化反応させる。

【0077】

【化3】



【0078】

[上記一般式(1)中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 及び $\text{R}^3$ は、それぞれ独立して、置換されていないか少なくとも一部のHが置換されている、直鎖若しくは分岐鎖のアルキル基または芳香族基を示し、Tfは、トリフルオロメタンスルフォニル基を示す。]

【0079】

上記プロモーターを用いることで、驚くべきことに、同じルイス酸である $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ に比べ、20～60%以上収率を向上させることができる。

【0080】

上記プロモーターとしては、例えば、トリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル、トリフルオロメタンスルホン酸トリエチルシリル、トリフルオロメタンスルホン酸トリプロピルシリル、トリフルオロメタンスルホン酸ジメチルエチルシリル、トリフルオロメタンスルホン酸トリベンジルシリル、トリフルオロメタンスルホン酸トリナフチルシリル又はトリフルオロメタンスルホン酸トリベンジルメチルシリル等を挙げることができる。

【0081】

本発明においては、収率の点で、上記一般式(1)中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 及び $\text{R}^3$ が、H又は直鎖若しくは分岐鎖のアルキル基であるプロモーターが好ましい。通常、入手が容易であることから、トリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル( $\text{TMSOTf}$ )を用いる。

【0082】

本発明における当該グリコシル化反応は、通常80.0℃以下の温度で、12～48時間反応させて行なう。また、モレキュラーシーブ等の捕捉体により、系内の水及びハロゲン化水素酸等を除去しておくことが好ましい。

【0083】

(B) 糖鎖還元末端の構成糖におけるグリコシル化に付する位置の保護基の脱離

【0084】

本発明の製造方法において更に糖鎖を伸長させる場合、(C)の項で述べる伸長反応に先立って、図2に示すように、上記(A)の工程で得られたオリゴ糖について、グリコシル化に付する位置に存する保護基を脱離する工程を行なう。

【0085】

当該脱離工程は、グリコシル化に付する位置の保護基及びその他の保護基に応じて、適宜、好適な脱離反応を選択すればよい。

【0086】

例えば、グリコシル化に供する位置の保護基として、 $\text{CH}_3\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}-$ 、*モ*

ノクロロアセチル等を用いる場合には、(A)の工程で得られたオリゴ糖を、エタノール／トルエン混合液等の有機溶媒に溶解後、ヒドラジン酢酸等と反応させることにより、目的の保護基を脱離することができる。

#### 【0087】

当該脱離反応は、通常0～60℃で0.5～5時間反応させて行なう。また、通常、保護基を脱離した目的のオリゴ糖を、高収率、高純度で単離するために、反応後、溶媒を除去し、残さをゲル濾過等で精製する。

#### 【0088】

##### (C) 伸長反応

本発明においては、図3に示すように、上記(B)工程によりグリコシル化に供する保護基を脱離したオリゴ糖を、更に、(A)工程と同様のプロモーターの存在下、(A)工程と同様の糖供与体とグリコシル化させることにより、構成糖が6以上のオリゴグリコサミノグリカンを製造する。

#### 【0089】

本発明においては、この工程においても(A)工程と同様のプロモーター、及び糖供与体を用いるため、構成糖が6以上の任意の鎖長を有するオリゴグリコサミノグリカンを、高い収率で化学合成することができる。

#### 【0090】

この工程の各種条件は、前記(A)の工程で述べたものと基本的に同様である。

#### 【0091】

本発明においては、前記保護基脱離工程(B)とこの伸長工程(C)を、1から8回の任意の回数繰り返すことで、6以上の構成糖からなる任意の鎖長のオリゴグリコサミノグリカンを製造することができる。本発明においては、単にこの反応サイクルの回数によって目的のオリゴグリコサミノグリカンの鎖長を制御すればよく、停止反応は不要である。また、所望の鎖長のもののみを簡易に得ることができる。もっとも、高い収率を維持して、所望のオリゴグリコサミノグリカンを効率的に製造するためには、保護基脱離工程(B)及び伸長工程(C)を1～6回繰り返すものが好ましく、1～5回繰り返すものがより好ましく、1～4回繰り返すものが特に好ましい。

#### 【0092】

##### (D) 全保護基の脱離、並びに選択的硫酸化

本発明の製造方法は、図4及び図5に示すように、前記(A)又は(C)工程の後、更に、これらの工程で得られたオリゴ糖の全保護基を脱離させる工程(図4に示す)、或いはこれらの工程で得られたオリゴ糖の全保護基を脱離させるとともに、各構成糖の特定の位置を選択的に硫酸化する工程(図5に示す)を含ませることができる。

#### 【0093】

前記(A)又は(C)工程で得られたオリゴ糖の全保護基を脱離させる場合には、前記の保護基の種類に応じて、適切な反応スキームにより、保護基を脱離する必要がある。

#### 【0094】

例えば、保護基が、 $\text{CH}_3\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}-$ 等の場合には、(A)又は(C)の工程で得られたオリゴ糖を、エタノール／トルエン混合液等の有機溶媒に溶解後、ヒドラジン酢酸等と反応させることにより、目的の保護基を脱離することができる。また、保護基がベンジリデン基、アルコキシベンジリデン基又はシクロヘキシリデン基等の場合には、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ／メタノール混合液等に、(A)又は(C)の工程で得られたオリゴ糖或いはその後他の保護基脱離工程に付したオリゴ糖を溶解後、カンファースルホン酸、酢酸、塩酸等の酸で加水分解することにより、保護基を脱離することができる。

また、アセチル基、ベンゾイル基等のアシル基は、水性テトラヒドロフラン等の溶媒中で水酸化リチウム等のアルカリを用いた加水分解により除去することができる。

#### 【0095】

(A)又は(B)の工程で得られたオリゴ糖の全保護基を脱離させるとともに、各構成糖における特定位置の水酸基を選択的に硫酸化するには、硫酸化する位置の保護基のみを

選択的に脱離させ、その他の水酸基を保護した状態で硫酸化を行なう必要がある。

【0096】

具体的には、例えば、各N-アシルガラクトサミンの4位及び6位を選択的に硫酸化するためには、各N-アシルガラクトサミンの4位及び6位を、ベンジリデン基、アルコキシベンジリデン基及び／又はシクロヘキシリデン基で保護し、各グルクロン酸誘導体の総ての水酸基及びカルボキシル基を、アルキル基又はアシル基で保護した糖供与体及び糖受容体を用いて、前記(A)又は(A)～(C)の工程を行なう。

【0097】

次いで、(A)又は(C)の工程で得られたオリゴ糖の非還元末端にある構成糖がN-アシルガラクトサミンの場合には、その4位及び6位以外の水酸基をピバロイル基で置換する。

【0098】

例えば、 $\text{CH}_3\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}-$ 等の保護基をピバロイル基で置換する場合には、 $\text{CH}_3\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}-$ 等の保護基を持つオリゴ糖を、エタノール／トルエン混合溶媒等に溶解後、ヒドラジン酢酸と反応させて、 $\text{CH}_3\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}-$ 等の保護基を脱離させ、次いで、得られた化合物を、ピリジン等に溶解後、塩化ピバロイルと、N,Nジメチルアミノピリジン等の触媒の存在化で、反応させればよい。

【0099】

次いで、ピバロイル化されたオリゴ糖のベンジリデン基、アルコキシベンジリデン基及び／又はシクロヘキシリデン基を脱離させ、N-アシルガラクトサミンの4位及び6位を選択的に脱保護する。

【0100】

例えば、ベンジリデン基等の脱離は、ジクロロメタン／メタノール混合液等に、硫酸化の対象であるオリゴ糖を溶解後、カンファースルホン酸、酢酸、塩酸等の酸で加水分解することにより、実施できる。

【0101】

硫酸化は、上記工程により、N-アシルガラクトサミン構成糖の4位及び6位のみが脱保護されたものを対象とし、対象とするオリゴ糖を、ジメチルホルムアルデヒド等の溶媒に溶解後、三酸化硫黄トリメチルアミン錯体等と反応させて行なえばよい。反応温度は、通常0～60℃であり、反応時間は、通常12～72時間である。

【0102】

なお、その他の保護基脱離工程は、前記した通りである。また、目的のオリゴ糖を、高収率、高純度で単離するために、各工程終了後、溶媒を留去し、残さをゲル濾過等で精製することが好ましい。

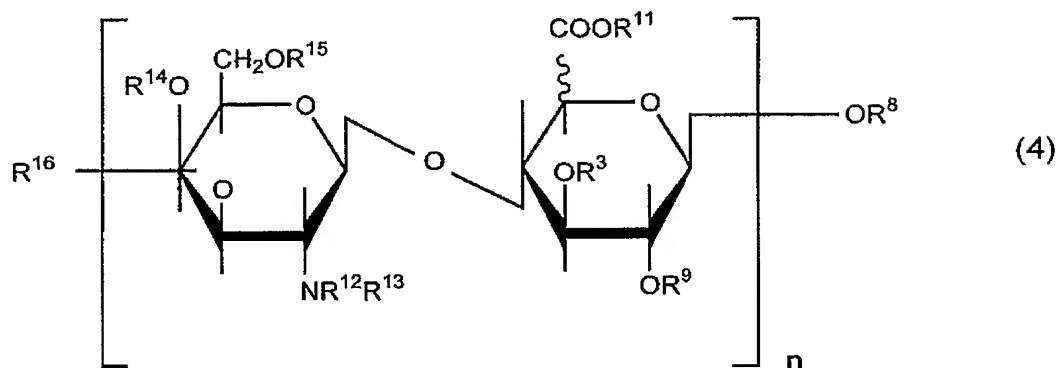
【0103】

次に、以上のような化学的合成方法により得られる、本発明の新規オリゴグリコサミノグリカンについて説明する。

【0104】

本発明の新規オリゴグリコサミノグリカンは、還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン(硫酸)等に関するものであり、下記一般式(4)で表されるものである。

## 【化4】

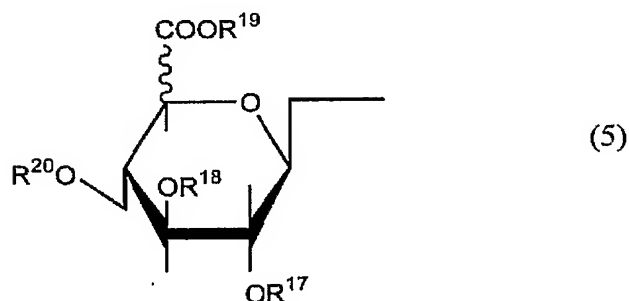


## 【0105】

[上記一般式(4)中、 $R^8$ は、水素原子または保護基を示し、 $R^9 \sim R^{11}$ は、同一又はそれぞれ独立して、水素原子又は保護基であり、 $R^{12}$ 及び $R^{13}$ は、同一又はそれぞれ独立して、水素原子、アルキル基、アリル基、アシル基及びフタロイル基、好ましくはアセチル基、ハロアセチル基、ベンゾイル基及びフタロイル基からなる群より選択され、 $R^{14}$ 及び $R^{15}$ は、それぞれ独立して、水素原子、或いは硫酸基若しくはリン酸基又はこれらのナトリウム、カリウム、銅、カルシウム、鉄、マンガン、亜鉛、アンモニウム、バリウム及びリチウムからなる群から選択され何れか1種の塩を示し、 $R^{16}$ は、水素原子、下記一般式(5)に表されるグルクロン酸誘導体若しくはイズロン酸誘導体、又は保護基を示す。また、上記一般式(4)中、 $n$ は、3～10の整数である。]

## 【0106】

## 【化5】



## 【0107】

[上記一般式(5)中、 $R^{17}$ 、 $R^{18}$ 及び $R^{19}$ は、前記一般式(4)の $R^2 \sim R^4$ と同じであり、 $R^{20}$ は、前記一般式(4)の $R^1$ と同じである。]

## 【0108】

本発明の還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン(硫酸)等においては、上記式(4)中の $R^8$ 及び $R^{16}$ が示す保護基について特に制限はないが、例えばメトキシフェニル基を挙げることができる。

## 【0109】

また、本発明の還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン(硫酸)等は、次に述べるCD44に対するシェディング誘導能の点で、上記一般式(4)中の $R^{14}$ 及び $R^{15}$ の少なくとも1つが硫酸基であるものが好ましく、 $R^{14}$ 及び $R^{15}$ が硫酸基であるものが特に好ましい。

## 【0110】

また、一般式(4)に表される還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン若しくは還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン硫酸またはそれらの誘導体の塩としては、アルキル金属塩が好ましく、特にカリウム、ナトリウム塩が好ましい。

## 【0111】

本発明の還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン(硫酸)等は、上記の如く、還元末端は常にグルクロン酸(誘導体)であり、酵素分解による方法では得られない構造を有する。しかも、本発明の還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン(硫酸)等は、生体成分である脂質や蛋白等の混入は全くなく、更には、特定の1の鎖長を有するもののみからなる点でも酵素分解による方法で得られるものとは異なる。

## 【0112】

更に、前記本発明の製造方法により製造した結果、従来の化学合成法では得られない6以上の構成糖からなるものを初めて提供できたものであり、この分野の研究に大きく寄与するものと確信する。

## 【0113】

次に、本発明の還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン(硫酸)等の応用について説明する。

## 【0114】

本発明の還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン(硫酸)等は、CD44分子に対するシェディング誘導能に関し、高い生理活性を有するものである。

## 【0115】

従って、CD44分子によって誘発される疾患または症状を、改善、治療または予防するための、活性成分として用いることができる。

## 【0116】

具体的には、本発明の還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン(硫酸)等を、そのまま、CD44分子の関与によって誘発される疾患または症状を、改善、治療または予防するための医薬として用いることもできる。勿論、本発明の還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン(硫酸)等を上記医薬を製造するために用いて、当該還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン(硫酸)等を製剤上許容される担体等と共に含有する医薬組成物を製造することもできる。

## 【0117】

本発明の医薬は、CD44分子の関与によって誘発される疾患または症状に広く適用可能であるが、具体的には、例えば慢性関節リュウマチ、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、シューグレン症候群、橋本病、アジソン病、又はI型糖尿病等の自己免疫疾患、例えば変形性関節症、乾癬性関節炎、腰痛症、肩関節周囲炎、顎関節症又は腱周囲炎等の関節炎、例えばアレルギー性鼻炎、花粉症、失神、蕁麻疹、アトピー性皮膚炎又は気管支喘息等アレルギー性疾患、又は癌を治療するため、或いは、免疫調節、細胞分化の誘導又は細胞アポトーシスを誘導するために用いることができる。

## 【0118】

特に、後述する実施例で示すように、N-アシルガラクトサミンの4位及び6位を硫酸化したものは、CD44分子に対するシェディング誘導能が大きく、上記適応症に対する治療効果が大きい。

## 【0119】

本発明の医薬組成物は、投与形態、剤型について特に制限はなく、経口、経皮、吸収、注射(筋肉内投与、皮内投与、皮下投与、静脈内投与、関節腔内投与、眼内投与、腹腔内投与)等の投与形態に応じて、製剤化することができる。剤型としては、例えば注射剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、錠剤、液剤、リポ化剤、軟膏剤、ゲル剤、スプレー剤、吸入散剤、点眼剤、又は眼軟膏剤等を挙げることができる。成人における1日の投与量は、通常、0.1~1000mgであるが、患者の体重、症状等によって適宜増減する場合がある。また、本発明の医薬組成物は、賦型剤、結合剤、滑沢剤、着色剤、甘味剤、又は崩壊

剤等の通常用いられる他の成分を含有することができる。また、有効成分として、他の自己免疫疾患治療剤、関節炎治療剤、アレルギー性疾患治療剤、免疫調節剤、細胞分化誘導剤又は細胞アポトーシス誘導剤を含有することもできる。

#### 【発明の効果】

##### 【0120】

以上説明したように、本発明によれば、4以上、特に6以上の構成糖からなる任意の鎖長及び構造のオリゴグリコサミノグリカン、高収率、高純度で製造できる簡易な方法を提供することができる。また本発明によれば、6以上の任意の数の構成糖からなる高純度の還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン硫酸及びこれを含む医薬組成物を提供することができる。

##### 【0121】

以下、本発明をより詳細に説明するために、本発明の実施例について説明する。但し、本発明は、以下の実施例により何ら限定されるものではない。

#### 【実施例】

##### 【0122】

以下に示す実施例では、各工程に適用した処理または得られた化合物の分析を以下の条件で行なった。

##### (1) 旋光度

HORIBA SEPA-200により $22 \pm 3^\circ\text{C}$ で測定した。

##### (2) $^1\text{H}$ NMR

JEOL ECPにより500 MHzで測定した。化学シフトは、例えば糖残基3のC-1に結合したプロトンを $\delta$ のごとく表した。

##### (3) シリカゲルクロマトグラフィー

シリカゲルは、和光純薬社製のSilica Gel C-200及びC-300と、関東化学社製のSilica Gel 60N (中性、球状、 $40\text{--}100\mu\text{m}$ )を使用した。ゲルろ過担体はAmersham Biosciences社製のSephadex LH-20及びLH-60を使用した。

##### (4) モレキュラーシーブス (MS)

モレキュラーシーブスは、GL Science社製を使用し、減圧下 $180^\circ\text{C}$ で乾燥して用いた。

##### (実施例1)

$\beta\text{-D-GalNAc}-(1\rightarrow[4)-\beta\text{-D-GlcA}-(1\rightarrow3)-\beta\text{-D-GalNAc}-(1\rightarrow)_24)-\beta\text{-D-GlcA}-(1\rightarrow\text{OMP} (1)$   
と  $\beta\text{-D-GalNAc}(4,6\text{-di-OSO}_3\text{Na})-(1\rightarrow[4)-\beta\text{-D-GlcA}-(1\rightarrow3)-\beta\text{-D-GalNAc}(4,6\text{-di-OSO}_3\text{Na})$   
 $-(1\rightarrow)_24)-\beta\text{-D-GlcA}-(1\rightarrow\text{OMP} (2)$ の製造方法。

##### 【0123】

本実施例の反応工程の概略を示す図6-1及び図6-2を参照しながら以下に具体的に説明する。

##### 【0124】

#### (A) 4の構成糖からなる還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチンの合成

##### (A-1) 第1の糖供与体の調整

図6-1中、式(10)で表わされる二の構成糖からなる化合物は公知であり、[J. Tamura et al., Carbohydr. Res., 305, 43-63 (1998)]に記載の方法により調製した。簡単に説明すると、単糖の糖供与体と単糖の糖受容体をグルコシル化した後、保護基をイミデート化することにより得た。

##### 【0125】

この式(10)で表される二の構成糖からなる化合物 ( $172.7\text{mg}$ ,  $0.184\text{mmol}$ )を、アセトニトリル ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $8\text{mL}$ )と水 ( $2\text{mL}$ )の混合液に溶解し、これに、硝酸二アンモニウムセリウム (IV) ( $\text{CAN}$ ,  $500\text{mg}$ )を加えて、1時間攪拌した。

##### 【0126】

反応終了後、反応液をクロロホルム ( $\text{CHCl}_3$ )と飽和食塩水で希釈した。有機層は飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過後、溶媒を減圧留去した。残渣

をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（シリカゲル60N、球状、中性、10g、トルエン／酢酸エチル3：2～1：5または酢酸エチル／メタノール50：1）で精製し、ヘミアセタール化合物（125.7 mg）を得た。

#### 【0127】

次いで、得られたヘミアセタール化合物を、ジクロロメタン（ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 5 mL）で希釈し、トリクロロアセトニトリル（ $\text{CCl}_3\text{CN}$ , 0.5 mL）を加え、攪拌しながら、0℃で1, 8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデカー7-エン（1滴）を加えた。30分後、室温にて $\text{CCl}_3\text{CN}$ （0.2 mL）を追加し、さらに10分間攪拌を続けた。反応液をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（C-200, 30g, トルエン／酢酸エチル2：1～1：50）で精製し、式（11）の2糖化合物（131.1 mg）を73%の収率で得た（式（11）の化合物のRf値は、0.58（酢酸エチル／メタノール10：1）であった。）。この化合物はこれ以上精製せず、糖供与体として以後の反応に使用した。

#### 【0128】

##### （A-2）糖受容体

図6-1中、式（12）で表される二の構成糖からなる化合物は公知であり、[J. Tamura et al., Carbohydr. Res., 305, 43-63 (1998)]に記載の方法により調製した。簡単に説明すると、単糖の糖供与体と単糖の糖受容体をグルコシル化した後、脱保護することにより得た。

#### 【0129】

##### （A-3）4糖中間体の合成

上述した、式（11）で示される糖供与体（1.18 g, 1.21 mmol）と、式（12）で示される糖受容体（858.6 mg, 1.02 mmol）の $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ （43 mL）溶液に、乾燥モレキュラーシーブスAW300（MSAW300（5g））を加え、室温にて1時間攪拌した。これを-20℃に冷却し、攪拌しながらトリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル（ $\text{TMSOTf}$ , 213  $\mu\text{L}$ , 1.18 mmol）を加えた。反応液を徐々に室温にまで上昇させ、1日後、反応液にトリエチルアミンと飽和炭酸水素ナトリウム溶液を加え、 $\text{CHCl}_3$ で希釈した。

#### 【0130】

不溶物をろ過し、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過後、溶媒を減圧留去した。残渣をゲルろ過（ $\text{LH-20}$ ,  $\text{CHCl}_3$ ／メタノール1：1）とシリカゲルカラムクロマトグラフィー（C-200, 30g, トルエン／酢酸エチル2：1～1：2）で精製し、式（13）の化合物（1.20 g, 71%）を得た。物性データは、[J. Tamura et al., Carbohydr. Res., 305, 43-63 (1998)]で示すデータと一致した。

#### 【0131】

##### （B）4の構成糖からなる中間体のレブリノイル基の除去

上述のようにして得られた式（13）で示される4の構成糖からなる中間体（71.8 mg, 43.3  $\mu\text{mol}$ ）のエタノール／トルエン5：1溶液（5 mL）に、ヒドラジン酢酸（40.0 mg, 434  $\mu\text{mol}$ ）を加え、室温にて20分間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣をゲルろ過（ $\text{LH-20}$ ,  $\text{CHCl}_3$ ／メタノール1：1）で精製し、以下の物性値を示す式（14）の化合物を収率92%（62.0 mg）で得た。

#### 【0132】

##### （物性値）

(1) Rf 0.32 （酢酸エチル／メタノール40：1）

(2)  $[\alpha]_{\text{D}} +13^\circ$  (c 0.43,  $\text{CHCl}_3$ )

##### (3) 元素分析

a) 計算値 ( $\text{C}_{83}\text{H}_{86}\text{N}_2\text{O}_{28} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) C, 63.18; H, 5.63; N, 1.78

b) 実測値 C, 62.90; H, 5.52; N, 1.71

(4)  $^1\text{H}$  NMR data ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.89-7.81 (8H, m, Ar), 7.48-7.47 (2H, m, Ar), 7.36-7.27 (8H, m, Ar), 7.19-7.13 (6H, m, Ar), 7.10-7.06 (2H, m, Ar), 6.89-6.87 (2H, m, Ar), 6.75-6.73 (2H, m, Ar), 5.73 (1H, bt,  $J = 8.87$  Hz, H-31), 5.61 (1H, dd,  $J_{2,3} = 5.27$ ,  $J_{3,4} = 8.02$  Hz, H-33), 5.54 (1H, d,  $J_{2,\text{NH}} = 7.79$  Hz, NH4), 5.49 (1H, dd,  $J_{1,2} = 6.88$ ,  $J_{2,3} = 8.94$  Hz, H-21), 5.49 (1H, s, PhCH), 5.44 (1H, d,  $J_{2,\text{NH}} = 6.18$  Hz, NH2), 5.31 (1H, s, PhCH), 5.22 (1H, t,  $J_{1,2} = 5.27$  Hz, H-23), 5.18 (1H, d, H-11), 5.17 (1H, d,  $J_{1,2} = 8.24$  Hz, H-14), 5.02 (1H, d, H-13), 4.68 (1H, dd,  $J_{2,3} = 11.00$ ,  $J_{3,4} = 3.67$  Hz, H-34), 4.64 (1H, brt,  $J = 10.08$  Hz, H-43), 4.53 (1H, brt,  $J = 8.83$  Hz, H-41), 4.29 (1H, s, H-44), 4.28 (1H, d,  $J_{1,2} = 10.31$  Hz, H-12), 4.25 (1H, d,  $J_{4,5} = 10.31$  Hz, H-53), 4.22 (1H, d,  $J_{4,5} = 9.16$  Hz, H-51), 3.85 (1H, m, H-6a4), 3.84 (1H, brs, H-42), 3.78 (1H, m, H-6a2), 3.75 (1H, m, H-22), 3.74, 3.72, 3.72 (3Hx3, 3s, 2 COOMe, MeOPh), 3.69 (1H, m, H-6b4), 3.52 (1H, m, H-6b2), 3.34 (1H, m, H-32), 3.25 (1H, m, H-24), 3.03 (1H, s, H-54), 2.68 (1H, s, H-52), 2.37, 2.35, 2.34, 2.30 (3Hx4, 4s, 4 MePh), 1.91 (3H, s, MeC O), 1.71 (3H, s, MeCO).

## 【0133】

## (C) 伸長反応による6の構成糖からなる中間体の合成

図6-1中、式(11)で示される化合物(144.3 mg, 0.148 mmol)と式(14)で示される化合物(160.6 mg, 0.103 mmol)の $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (7 mL)溶液に、MSAW300 (700 mg)を加え、室温にて1時間攪拌した。これを $-20^\circ\text{C}$ に冷却し、攪拌しつつ $\text{TMSOTf}$  (19  $\mu\text{L}$ , 0.11 mmol)を加えた。反応液は徐々に室温にまで上昇させ、1日後、反応液にトリエチルアミンと飽和炭酸水素ナトリウム溶液を加え、 $\text{CHCl}_3$ で希釈した。

## 【0134】

不溶物をろ過し、有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過後、溶媒を減圧留去した。残渣をゲルろ過(LH-60,  $\text{CHCl}_3$  / メタノール 1:1)とシリカゲルカラムクロマトグラフィー(C-300, 6 g, トルエン/酢酸エチル 1:1 ~ 1:5、酢酸エチル/メタノール 100:1)で精製し、式(9)の化合物(161.4 mg, 66%)を得た。

## 【0135】

## (物性値)

(1) Rf 0.42 (酢酸エチル/メタノール 40:1)

(2)  $[\alpha]_D^{25} +24^\circ$  (c 0.56,  $\text{CHCl}_3$ )

## (3) 元素分析

a) 計算値 ( $\text{C}_{126}\text{H}_{131}\text{N}_3\text{O}_{43} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) C, 62.75; H, 5.65; N, 1.74

b) 実測値 C, 62.89; H, 5.52; N, 1.72%

(4)  $^1\text{H}$  NMR data ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.96 (2H, d,  $J = 8.02$  Hz, Ar), 7.91-7.88 (3H, m, Ar), 7.85-7.80 (6H, m, Ar), 7.62 (1H, d,  $J = 7.33$  Hz, Ar), 7.48 (1H, d,  $J = 6.41$  Hz, Ar), 7.38-7.35 (2H, m, Ar), 7.32-7.21 (17H, m, Ar), 7.18-7.13 (5H, m, Ar), 7.06 (2H, d,  $J = 8.02$  Hz, Ar), 6.90-6.86 (2H, m, Ar), 6.76-6.73 (2H, m, Ar), 5.73 (1H, t,  $J_{2,3} = J_{3,4} = 8.93$  Hz, H-31), 5.67 (1H, s, PhCH), 5.60-5.56 (2H, m, H-33, 35), 5.49 (1H, s, PhCH), 5.48 (1H, dd,  $J_{1,2} = 7.33$  Hz, H-21), 5.46 (1H, d,  $J_{2,\text{NH}} = 7.56$  Hz, NH6), 5.26 (1H, s, PhCH), 5.17 (1H, m, H-23), 5.17 (2H, d, H-11, 16), 5.04-4.98 (3H, m, H-13, 15, 25), 4.83 (1H, dd,  $J_{3,4} = 7.56$ ,  $J_{4,5} = 10.54$  Hz, H-45), 4.65 (2H, m, H-43, 36), 4.62 (1H, d,  $J_{2,\text{NH}} = 8.71$  Hz, NH4), 4.51 (1H, brt,  $J = 9.05$  Hz, H-41), 4.46 (1H, d,  $J_{3,4} = 3.44$  Hz, H-44), 4.34 (1H, d,  $J_{3,4} < 5.5$  Hz, H-46), 4.32 (1H, d,  $J_{4,5} = 10.77$  Hz, H-55), 4.30 (1H, dd,  $J_{2,3} = 10.31$ ,  $J_{3,4} = 3.36$  Hz, H-32), 4.23 (1H, d,  $J_{4,5} = 9.85$  Hz, H-53), 4.20 (1H, d,  $J_{4,5} = 9.17$  Hz, H-51), 4.14 (1H, d,  $J_{1,2} = 8.71$  Hz, H-12), 4.04 (1H, bt,  $J =$



9.91 Hz, H-22), 3.91 (2H, d,  $J = 12.15$  Hz, H-6a2, 6a4), 3.88 (1H, d, H-42), 3.87 (1H, m, H-34), 3.86 (1H, m, NH2), 3.83 (1H, d,  $J_{\text{gem}} = 6.65$  Hz, H-6a6), 3.75-3.66 (2H, m, H-14, 24), 3.72 (1H, m, H-6b4), 3.72, 3.71, 3.65 (3Hx4, 3s, 3 COOMe, MeOPh), 3.69 (1H, m, H-6b6), 3.53 (1H, d,  $J_{\text{gem}} = 8.25$  Hz, H-6b2), 3.24 (1H, m, H-26), 2.97 (1H, s, H-56), 2.78 (1H, s, H-54), 2.70-2.41 (4H, m, 2CH<sub>2</sub>), 2.52 (1H, s, H-52), 2.43, 2.40, 2.38, 2.37, 2.34, 2.30 (18H, 6s, 6 MePh), 2.03 (3H, s, COCH<sub>3</sub>), 1.80, 1.77, 1.72 (3Hx3, 3s, 3NAc).

#### 【0136】

##### (D) 6の構成糖からなる中間体のレプリノイル基の除去

図6-2に示すように、上述のようにして得られた式(9)で表される化合物(30.8 mg, 13.0  $\mu\text{mol}$ )のエタノール/トルエン4:1溶液(2.5 mL)に、ヒドラジン酢酸(12.6 mg, 28.2  $\mu\text{mol}$ )を加え、室温にて1時間攪拌した。溶媒を減圧留去し、残渣をゲルろ過(LH-20, CHCl<sub>3</sub>/メタノール1:1)で精製し、以下の物性値を示す式(15)の化合物(29.9 mg)を定量的に得た。

#### 【0137】

##### (物性値)

(1)  $R_f$  0.43 (酢酸エチル/メタノール10:1)

(2)  $[\alpha]_D + 19^\circ$  (c 0.68, CHCl<sub>3</sub>)

NMRデータは(4)に変更。

##### (3) 質量分析

a) 計算値(C<sub>121</sub>H<sub>125</sub>N<sub>3</sub>O<sub>41</sub>Na, [M+Na]<sup>+</sup>) 2298.77,

b) 実測値 2298.94

(4) <sup>1</sup>H NMR data (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.91-7.79 (12H, m, Ar), 7.54 (2H, d,  $J = 7.11$  Hz, Ar), 7.45-7.44 (2H, m, Ar), 7.37-7.28 (12H, m, Ar), 7.23-7.12 (9H, m, Ar), 7.06 (2H, d,  $J = 8.25$  Hz, Ar), 6.89-6.87 (2H, m, Ar), 6.75-6.74 (2H, m, Ar), 5.72 (1H, bt,  $J = 8.82$  Hz, H-31), 5.60 (1H, dd,  $J_{2,3} = 3.90$ ,  $J_{3,4} = 7.55$  Hz, H-35), 5.58 (1H, dd,  $J_{2,3} = 6.18$ ,  $J_{3,4} = 8.24$  Hz, 33), 5.56 (1H, s, PhCH), 5.48 (1H, dd,  $J_{1,2} = 7.10$ ,  $J_{2,3} = 8.94$  Hz, H-21), 5.44 (1H, s, PhCH), 5.40 (1H, d,  $J_{2,\text{NH}} = 6.63$  Hz, NH6), 5.33 (1H, s, PhCH), 5.20 (1H, bt,  $J = 5.83$  Hz, H-23), 5.17 (1H, d,  $J_{1,2} = 8.25$  Hz, H-16), 5.16 (1H, d, H-11), 5.08 (1H, bt,  $J = 4.01$  Hz, H-25), 5.00 (1H, d,  $J_{1,2} = 4.12$  Hz, H-15), 4.96 (1H, d,  $J_{1,2} = 5.73$  Hz, H-13), 4.92 (1H, d,  $J_{2,\text{NH}} = 6.88$  Hz, NH2), 4.75 (1H, d,  $J_{2,\text{NH}} = 8.70$  Hz, NH4), 4.73 (1H, dd,  $J_{4,5} = 10.54$  Hz, H-45), 4.69 (1H, d,  $J_{1,2} = 8.48$  Hz, H-14), 4.63 (1H, dd,  $J_{2,3} = 11.00$ ,  $J_{3,4} = 3.44$  Hz, H-36), 4.60 (1H, dd,  $J_{4,5} = 8.02$  Hz, H-43), 4.50 (1H, brt,  $J = 8.82$  Hz, H-41), 4.31 (1H, d,  $J_{3,4} = 4.12$  Hz, H-44), 4.29 (1H, d, H-55), 4.22 (1H, s, H-46), 4.19 (2H, d,  $J = 9.39$  Hz, H-51, 53), 4.13 (1H, d,  $J_{1,2} = 8.48$  Hz, H-12), 4.04 (1H, m, H-34), 3.89 (1H, d,  $J_{\text{gem}} = 12.37$  Hz, H-6a4), 3.86 (1H, d,  $J_{\text{gem}} = 12.61$  Hz, H-6a2), 3.84 (1H, d,  $J_{\text{gem}} = 11.45$  Hz, H-6a6), 3.84 (1H, d,  $J_{3,4} = 3.66$  Hz, H-42), 3.75 (1H, m, H-22), 3.73, 3.70, 3.65 (3Hx4, 3s, 3 COOMe, MeOPh), 3.65 (2H, m, H-6b4, 6b6), 3.54 (1H, d, H-6b2), 3.54 (1H, m, H-24), 3.23 (1H, ddd, H-26), 3.15 (1H, m, H-32), 2.96 (1H, s, H-56), 2.82 (1H, s, H-54), 2.59 (1H, s, H-52), 2.40, 2.38, 2.37, 2.35, 2.34, 2.30 (3Hx6, 6s, 6 MePh), 1.85, 1.70, 1.66 (3Hx3, 3s, 3NAc).

#### 【0138】

##### (E) 他の保護基(ベンジリデン基及びアシル基)の除去

上述のようにして得られた式(15)で示される化合物(17.8 mg, 7.82  $\mu\text{mol}$ )のCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/メタノール1:1溶液(1.6 mL)に、カンファースルホン酸(4.2 mg)を加え、室温にて12時間攪拌した。カンファースルホン酸(6.6 mg)を追加し、室温にてさらに24時間攪拌した。反応液に過剰のジイソプロピルエチルアミンを加え、溶媒を減圧留去し、残渣をゲルろ過(LH-20, CHCl<sub>3</sub>/メタノール

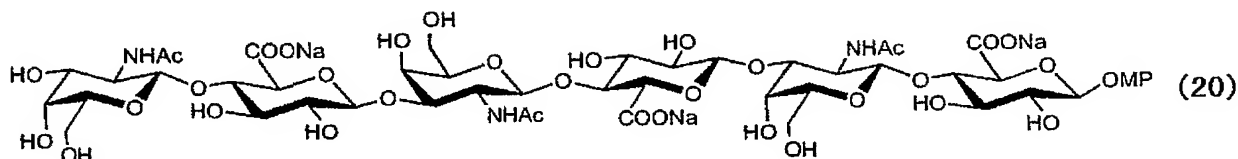
1:1)で精製し、式(17)の化合物を収率78%(12.2mg)で得た。

【0139】

<sup>1</sup>H NMRにより式(15)の化合物からベンジリデン基が除去されたことを確認した後、式(17)の化合物(5.4mg)を、テトラヒドロフラン/水15:1溶液(1.6mL)に溶解し、攪拌しながら1.25M水酸化リチウム水溶液(45μL)を0℃で加えた。1時間後、溶媒を減圧留去し、残渣にメタノール(1.5mL)を加え、これに0.1Mナトリウムメトキシド(0.5mL)を攪拌しながら滴下した。3日後、50%酢酸で反応を停止し、溶媒を減圧留去した。残渣をゲルろ過(LH-20, 1%酢酸)で精製し、下記式(20)に示す化合物を、収率92%(3.3mg)で得た。得られた化合物の物性値を以下に示す。

【0140】

【化6】



【0141】

(物性値)

(1) R<sub>f</sub> 0.32 (n-ブタノール/酢酸/水1:1:1)

(2) [α]<sub>D</sub> +20° (c 0.33, 水)

NMRデータは(4)に変更。

(3) 質量分析

a) 計算値(C<sub>49</sub>H<sub>58</sub>N<sub>3</sub>O<sub>35</sub>Na, [M+Na-3H]<sup>2-</sup>)640.68,

b) 実測値640.69

(4) <sup>1</sup>H NMR data (D<sub>2</sub>O): δ 7.09 (2H, d, J = 9.17 Hz, Ph), 6.96 (2H, d, J = 8.94 Hz, Ph), 5.07 (1H, d, J<sub>1,2</sub> = 7.79 Hz, H-11), 4.54 (1H, d, J<sub>1,2</sub> = 7.79 Hz, H-13 or 15), 4.53 (2H, d, J<sub>1,2</sub> = 7.56 Hz, H-12 or 14, 15 or 13), 4.49 (1H, d, J<sub>1,2</sub> = 8.48 Hz, H-14 or 12), 4.45 (1H, d, J<sub>1,2</sub> = 8.24 Hz, H-16), 4.09-4.07 (3H, m, H-42, 44, 46), 4.05-4.00 (1H, bt, J = 9.63 Hz, H-22 or 24), 3.98 (1H, bt, J = 9.74 Hz, H-24 or 22), 3.91-3.66 (19H, m, H-31, 41, 51, 32, 52, 62x2, 43, 53, 34, 54, 64x2, 45, 55, 36, 56, 66x2), 3.85 (1H, m, H-26), 3.80 (3H, s, MeOPh), 3.62 (1H, bt, J = 9.32 Hz, H-33 or 35), 3.61 (2H, bt, J = 8.83 Hz, H-21, 35 or 33), 3.36, 3.34 (2H, m, H-23, 25), 2.02 (3H, s, MeCO), 1.99 (6H, s, MeCO).

ESI-MS (negative): m/z: 640.69 (calcd for C<sub>49</sub>H<sub>58</sub>N<sub>3</sub>O<sub>35</sub>Na 640.68, [M+Na-3H]<sup>2-</sup>), 629.69 (calcd for C<sub>49</sub>H<sub>59</sub>N<sub>3</sub>O<sub>35</sub> 629.69, [M-2H]<sup>2-</sup>), 419.45 (calcd for C<sub>49</sub>H<sub>58</sub>N<sub>3</sub>O<sub>35</sub> 419.45, [M-3H]<sup>3-</sup>).

【0142】

(F) 選択的硫酸化(式(2)の化合物の合成)

図6-2に示すように、上述のようにして得られた式(15)で表される化合物(28.7mg, 12.6μmol)のピリジン溶液(1.5mL)に、塩化ピバロイル(30μL)と触媒量のN、N-ジメチルアミノピリジンを加え、80℃にて3時間攪拌した。塩化ピバロイル(90μL)を追加し、80℃でさらに2時間攪拌した。反応液を室温に戻し、過剰のメタノールを加え、反応液をゲルろ過(LH-20, CHCl<sub>3</sub>/メタノール1:1)で精製し、式(16)の化合物(27.0mg, 89%)を得た。

【0143】

次いで、式(16)の化合物(8.6mg, 3.6μmol)のCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/メタノール1:1溶液(1mL)に、カンファースルホン酸(2.9mg)を加え、室温にて20時間攪拌した。反応液に過剰のジイソプロピルエチルアミンを加え、溶媒を減圧留

去し、残渣をゲルろ過 (LH-20,  $\text{CHCl}_3$  / メタノール 1:1) で精製し、式 (18) の化合物 (8.1 mg) を定量的に得た。

【0144】

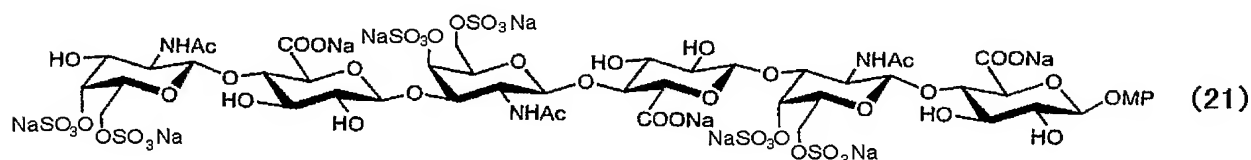
次いで、式 (18) の化合物 (8.1 mg,  $3.6 \mu\text{mol}$ ) のジメチルホルムアミド溶液 (0.5 mL) に、三酸化硫黄トリメチルアミン錯体 (60 mg) を加え、 $57^\circ\text{C}$  にて 22 時間攪拌した。三酸化硫黄トリメチルアミン錯体 (59 mg) を追加し、 $57^\circ\text{C}$  にてさらに 26 時間攪拌した。反応液を室温に冷却し、反応液をゲルろ過 (LH-20,  $\text{CHCl}_3$  / メタノール 1:1) とイオン交換樹脂 [Dowex 50W ( $\text{Na}^+$ )、メタノール/水 8:1] で精製し、式 (19) の化合物 (9.6 mg, 91%) を得た。

【0145】

最後に、式 (19) の化合物 (9.6 mg) を、テトラヒドロフラン (0.5 mL) と水 (0.04 mL) の混合溶液に溶解し、攪拌しながら 1.25 M 水酸化リチウム水溶液 (0.2 mL) を  $0^\circ\text{C}$  で加え、室温で一晩攪拌を続けた。溶媒を減圧留去し、残渣にメタノール (0.5 mL) と  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0.15 mL) を加え、これに 0.5 M 水酸化ナトリウム (0.3 mL) を攪拌しつつ滴下した。22 時間後、50% 酢酸で反応を停止し、溶媒を減圧留去した。残渣をゲルろ過 (LH-20, 1% 酢酸) で精製し、下記式 (21) に示す化合物を収率 54% (3.7 mg) で得た。得られた化合物の物性値を以下に示す。

【0146】

【化 7】



【0147】

(物性値)

(1)  $R_f$  0.14 ( $n$ -ブタノール 酢酸 水 1:1:1)

(2)  $[\alpha]_D -8.1$  ( $c$  0.37, 水)

NMR データは (4) に変更。

(3) 質量分析

a) 計算値 ( $\text{C}_{49}\text{H}_{62}\text{N}_3\text{O}_{35}\text{Na}_6$ ,  $[\text{M}-3\text{Na}]^3-$ ) 623.33,

b) 実測値 623.34

(4)  $^1\text{H}$  NMR data ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  7.09 (2H, d,  $J = 9.17$  Hz, Ar), 6.96 (2H, d,  $J = 9.17$  Hz, Ar), 5.12 (1H, d,  $J_{1,2} = 7.79$  Hz, H-11), 4.79 (2H, s, H-42, 44), 4.71 (1H, s, H-46), 4.65 (2H, m, H-12, 14), 4.60 (1H, d,  $J_{1,2} = 8.02$  Hz, H-16), 4.56, 4.55 (2H, 2d,  $J_{1,2} = 7.79$  Hz, H-13, 15), 4.32-4.21 (6H, m, H-62x2, 64x2, 66x2), 4.18 (1H, d,  $J_{4,5} = 9.85$  Hz, H-51), 4.11 (3H, m, H-52, 54, 56), 4.05-4.01 (3H, m, H-22, 24, 34 or 32), 4.00, 3.99 (2H, 2d,  $J_{4,5} = 9.62$  Hz, H-53, 55), 3.93-3.78 (7H, m, H-31, 41, 32 or 34, 43, 45, 26, 36), 3.80 (3H, s, MeOPh), 3.66 (1H, bt,  $J = 8.47$  Hz, H-33 or 35), 3.66 (1H, bt,  $J = 9.05$  Hz, H-35 or 33), 3.63 (1H, bt,  $J = 9.17$  Hz, H-21), 3.41 (1H, bt,  $J = 10.77$  Hz, H-23 or 25), 3.40 (1H, bt,  $J = 10.20$  Hz, H-25 or 23), 2.02 (3H, s, MeCO), 2.00 (6H, s, 2MeCO).

(比較例 1)

【0148】

図 7 に示すように、上記実施例 1 の糖供与体及び糖受容体、並びにプロモーターに代え、図中式 (3) 及び (4) で表されるアジド化した糖供与体と糖受容体を用いて、同じルイス酸である  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  の存在化で各グリコシル化反応を行なったこと、並びに、図中の式 (6) で表す化合物と、糖供与体との伸長反応終了後、式 (8) で表される反応生成

物を、酢酸エチル中、L i n d l a r 触媒の存在下で、水素添加しながら還元してNアセチル化したこと以外は、上記実施例1と同様にして、6の構成糖からなる還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン及びその硫酸化物を製造した。

#### 【0149】

(参考例)

B i o . M e d . C h e m . L e t t . 1995; 5 (13) : 1351-1354には、上記比較例1の製造方法のL i n d l a r 触媒に代え、チオ酢酸を用いた製造方法が提案されている。

#### 【0150】

(結果)

プロモーターとしてトリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル (TMSOTf) を用い、二糖体の段階でアジドの還元を行なった後、各糖鎖ユニットをグリコシド結合させた実施例1の製造方法では、図6-1の式(13)で表される4糖体で71%、式(20)及び(21)の6糖体でそれぞれ66%という高い収率で6の構成糖からなる還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン及び還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン硫酸が得られた。

#### 【0151】

これに対して、プロモーターとして $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ を用い、アジドタイプの糖供与体とアジドタイプの糖受容体とをグリコシル化して伸長反応を行ない、4糖体又は6糖体となった段階でアジド基を還元してNアセチル基に変換した比較例1の製造方法では、アジド化した4糖体を還元反応に付した場合の収率が50%であり実施例1より20%以上低かった。また、アジド化した6糖体(6)を還元反応させたところ、Nアセチル基への変換が起こらず目的とする式(9)の化合物は得られなかった。

#### 【0152】

また、参考例の方法では、アジド化した4糖体を還元反応に付した場合の収率ですら、43%と実施例1の方法に比べ、約30%低かった。

#### 【0153】

(考察)

本発明におけるイミデートを用いるグリコシル化反応では、イミドイルオキシ基が脱離して1位の炭素にカチオンが生じる。このカチオン中間体と糖受容体のフリーの水酸基が結合し、グリコシル化反応が進行する。実施例1でプロモーターとしたトリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル (TMSOTf) は、カチオン中間体とイオンペアを形成して不安定なカチオン中間体を安定化し、その分解を抑制したことで高収率化に至ったものと考えられる。従って、前記一般式(1)に包含される化合物であれば、同様の効果が期待できると考えられる。

また、糖供与体としてアセトアミドタイプの2糖ユニットを用いたことも高収率化に大きく貢献していることは言うまでもないところである。

#### 【0154】

(実施例2)

#### 合成オリゴ糖によるCD44シェディング誘導

実施例1で得られた式(20)及び(21)の化合物について、癌細胞におけるCD44シェディング誘導能を、図8に示す試験方法に基づき評価した。

#### 【0155】

<試験結果>

図9及び10に示すように、硫酸化されていない6の構成糖からなる還元末端グルクロン酸型コンドロイチンであっても、CD44のシェディングが誘導された。また、N-アシルガラクトサミンの4位と6位が硫酸化されている6の構成糖からなる還元末端グルクロン酸型コンドロイチン硫酸Eによって、還元末端グルクロン酸型コンドロイチンよりも強くCD44のシェディングが誘導された。

#### 【0156】

このことから、還元末端グルクロン酸型コンドロイチン硫酸 E の幹をなす還元末端グルクロン酸型コンドロイチン主鎖自体が、CD44 シェディング誘導能に関与していることに加え、還元末端グルクロン酸型コンドロイチン主鎖上の硫酸基も、CD44 シェディングの誘導に関与し、その活性を高めていることが実証された。

【0157】

なお、CD44 分子が、広く様々な疾患に関与することは既に知られており、本発明の 6 以上の構成糖からなる還元末端グルクロン酸型オリゴコンドロイチン硫酸が、その高い CD44 シェディング誘導能に基づき、CD44 分子が関与する疾患及び症状で有効であることは自明と思われる。

【図面の簡単な説明】

【0158】

【図 1】図 1 は、本発明の一の実施形態における (A) 工程の概略を示す反応式である。

【図 2】図 2 は、本発明の一の実施形態における (B) 工程の概略を示す反応式である。

【図 3】図 3 は、本発明の一の実施形態における (C) 工程の概略を示す反応式である。

【図 4】図 4 は、本発明の一の実施形態における保護基脱離工程の概略を示す工程図である。

【図 5】図 5 は、本発明の一の実施形態における選択的硫酸化の工程の概略を示す工程図である。

【図 6-1】実施例 1 の製造方法における工程の一部を概略的に示す工程図である。

【図 6-2】実施例 1 の製造方法における工程の一部を概略的に示す工程図である。

【図 7】比較例 1 の製造方法における工程を概略的に示す工程図である。

【図 8】実施例 2 で行なった試験方法の概略を示す工程図である。

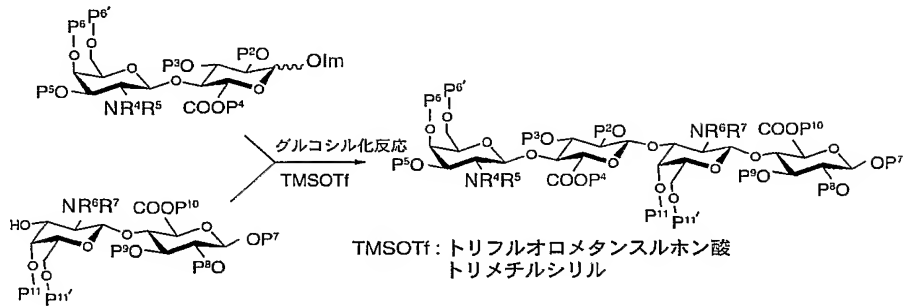
【図 9】実施例 2 で行なった試験の泳動結果を示す泳動写真のコピーである。

【図 10】実施例 2 で行なった試験における CD44 シェディング指数を示すグラフである。なお、CD44 シェディング指数は、無刺激の状態を 1 として求めた。

## 【書類名】 図面

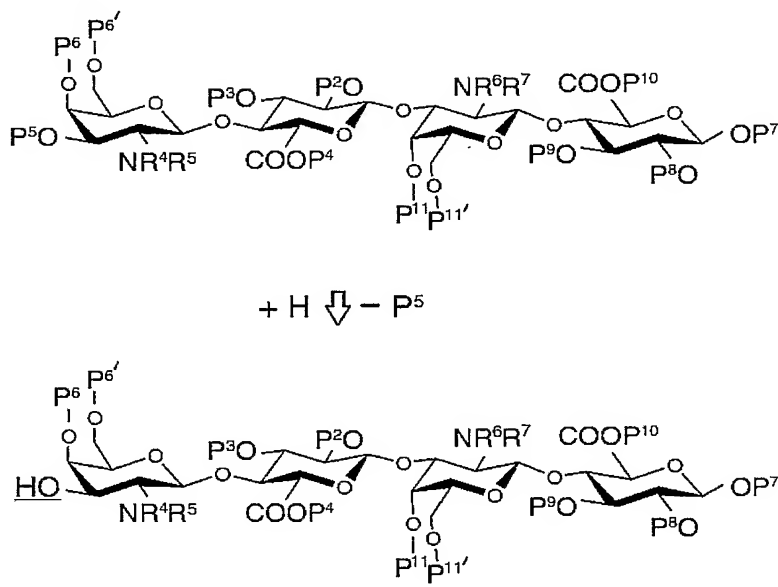
## 【図1】

A工程



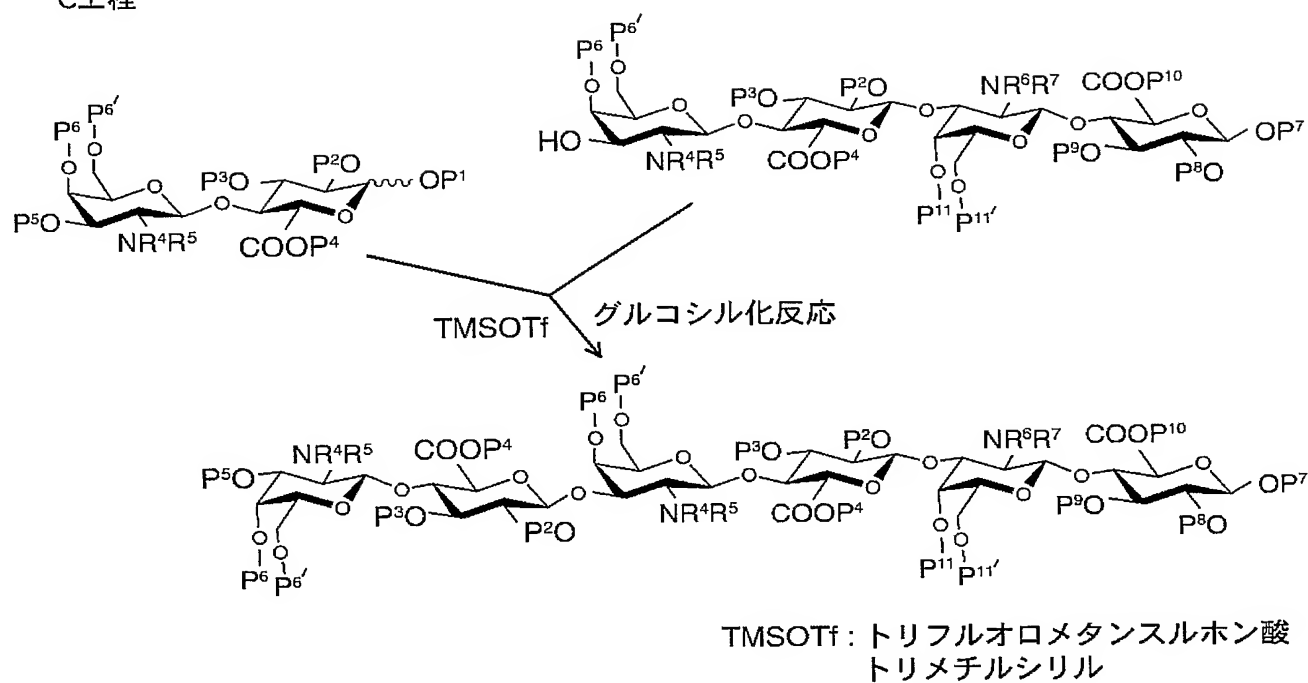
## 【図2】

B工程

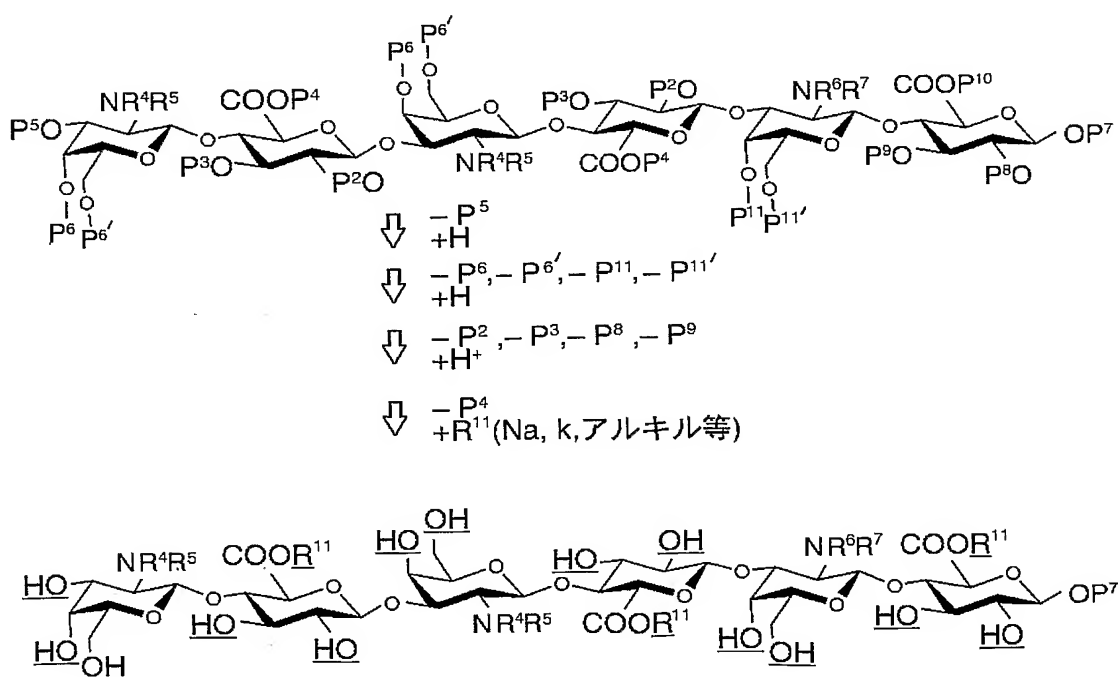


【図3】

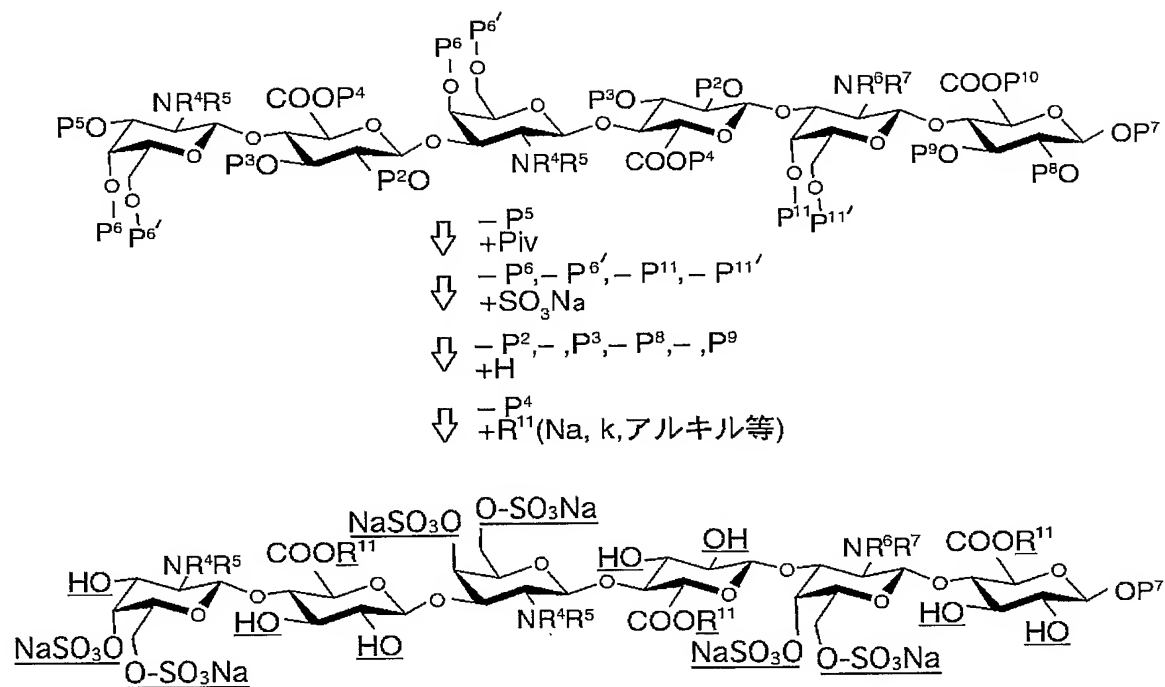
C工程



【図4】



【図 5】

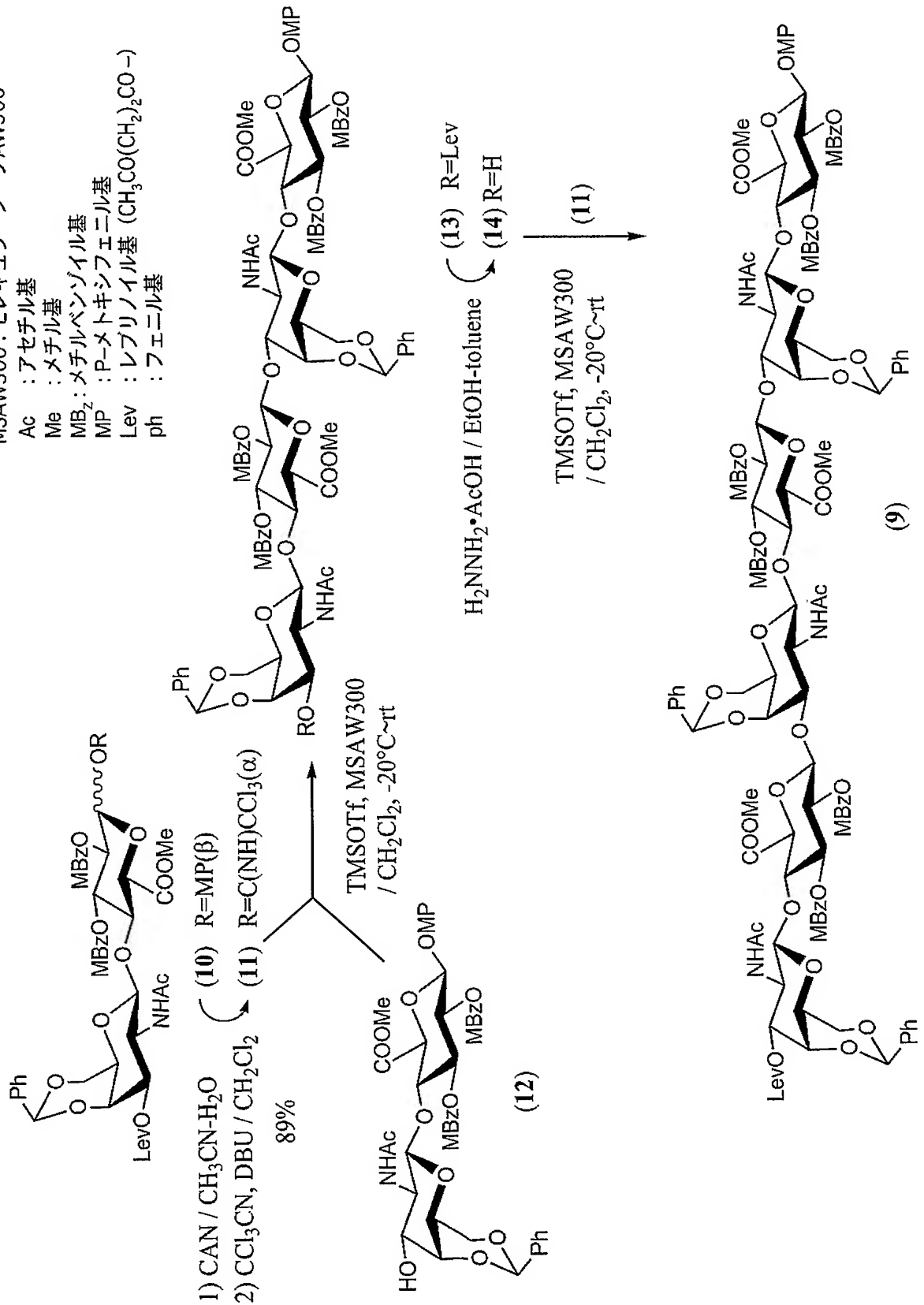




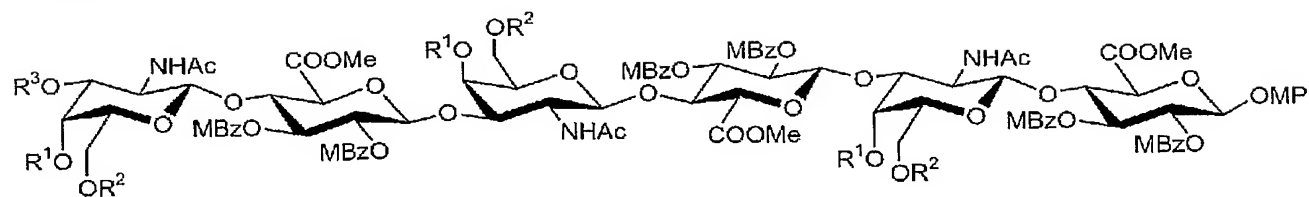
【図 6-1】

TMSOTf: トリフルオロメタンスルホン酸トリメチルシリル  
MSAW300: モレキュラーシーブAW300

Ac : アセチル基  
Me : メチル基  
MB<sub>2</sub>: メチルベンゾイル基  
MP : P-メトキシフェニル基  
Lev : レプリノイル基 (CH<sub>3</sub>CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO-)  
ph : フェニル基



【図 6-2】



(9)  $R^1, R^2 = >CHPh, R^3 = Lev$

(15)  $R^1, R^2 = >CHPh, R^3 = H$

(16)  $R^1, R^2 = >CHPh, R^3 = Piv$

(17)  $R^1 = R^2 = R^3 = H$

(18)  $R^1 = R^2 = H, R^3 = Piv$

(19)  $R^1 = R^2 = SO_3Na, R^3 = Piv$

20

21

Ac : アセチル基

Me : メチル基

MBz : メチルベンゾイル基

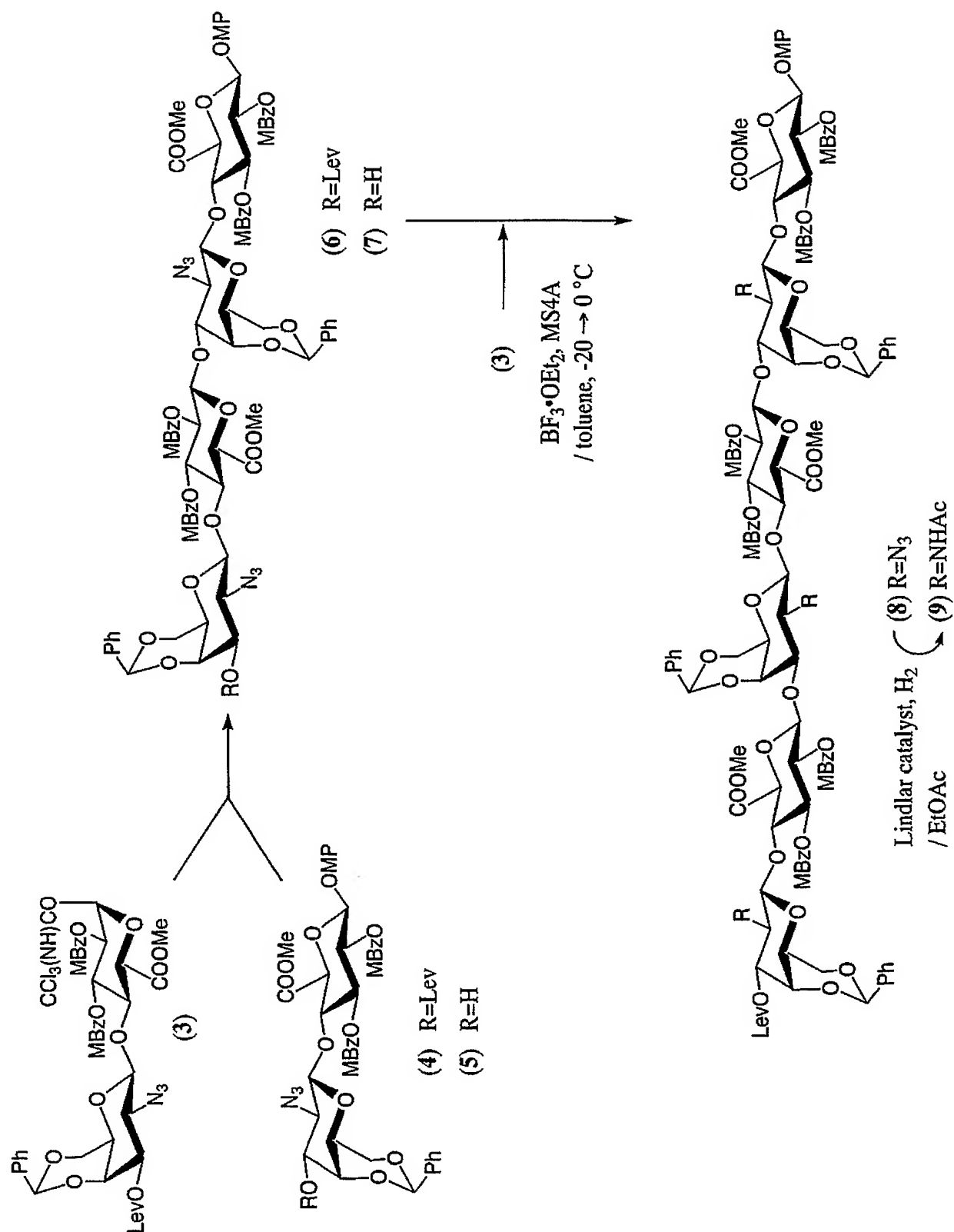
MP : p-メトキシフェニル基

Lev : レプリノイル基 ( $CH_3CO(CH_2)_2CO-$ )

Piv : ピバロイル基 ( $(CH_3)_3(CO-)$ )

ph : フェニル基

【図 7】

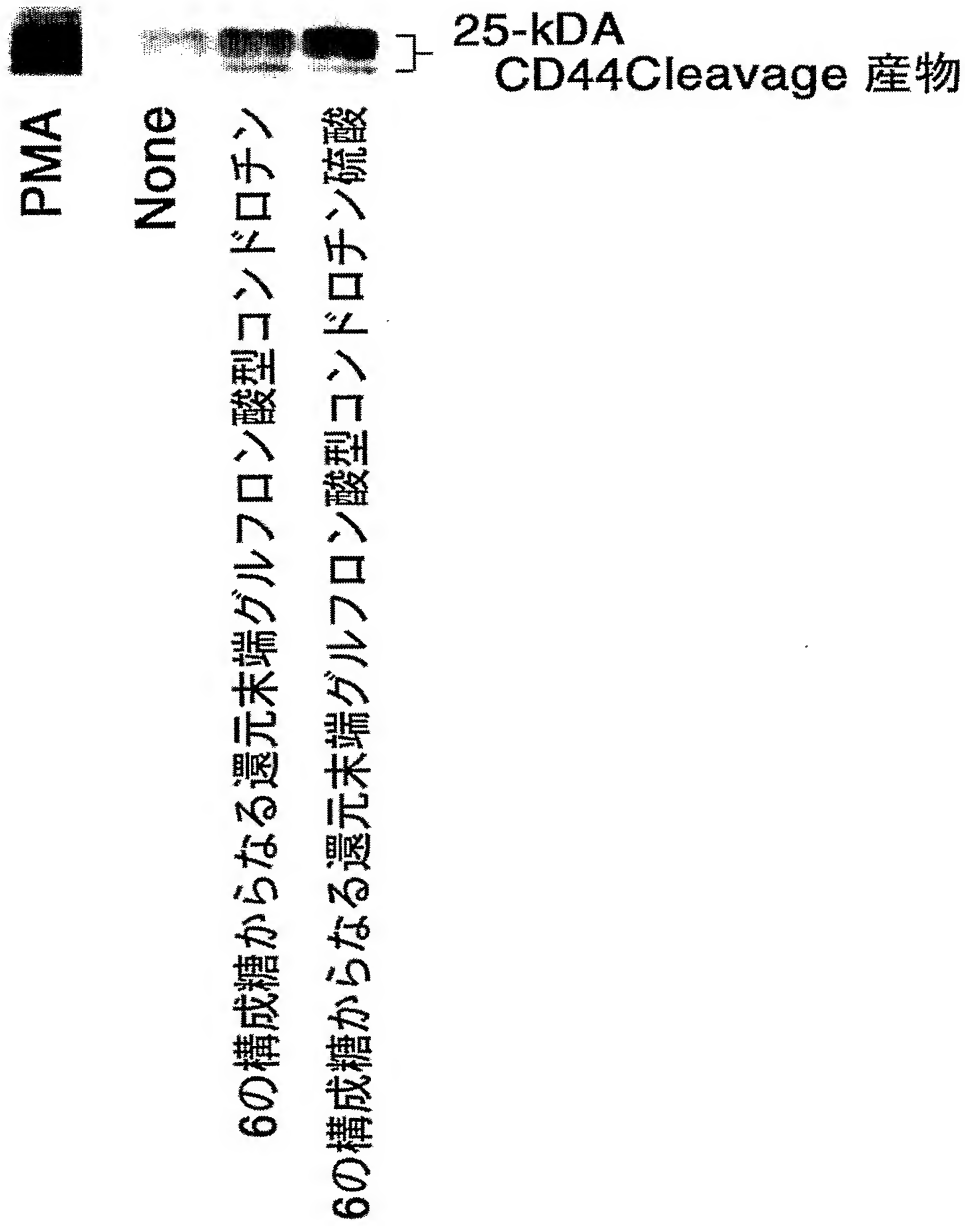


## 【図 8】

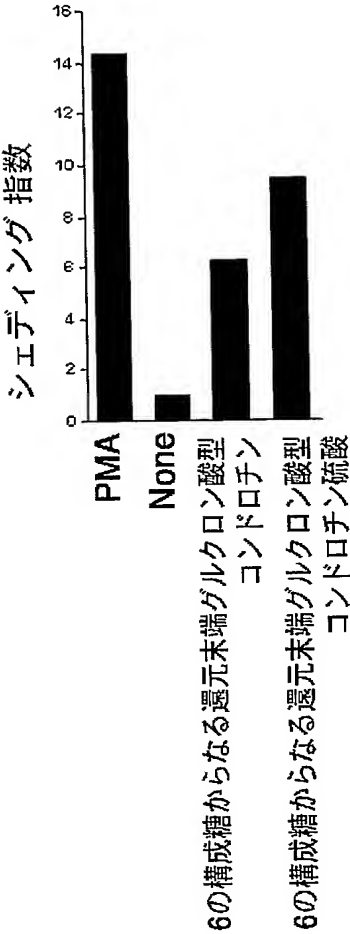
## ＜試験方法＞

- ↓ MIA PaCa-2 (ヒト膵がん細胞系列) を、 $1 \times 10^5$ /ウェルで 24 ウェルプレートに播種。
- ↓ インキュベーション (37°C、一晚)。
- ↓ 10  $\mu$ M システインプロテアーゼインヒビター (MG132) を加えてインキュベーション (37°C、30 min)。
- ↓ ・RCE6 又は RC6 を加えて、60 min インキュベーション (37°C)。
  - ・陽性対照は、ホルボールミリスチン酸エステル (PMA) を加えて 30 min インキュベート (37°C)。
  - ・陰性対照は、未添加。
- ↓ SDS 緩衝液で細胞を溶解した後に回収。
- ↓ SDS PAGE。
- ↓ ウェスタンブロット分析。
  - 一次抗体：抗ヒト細胞質 CD44 ウサギポリクローナル抗体
  - 二次抗体：西洋わさびペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギ IgG

【図 9】



【図 10】



## 【書類名】 要約書

## 【要約】

【課題】 4以上の構成糖からなる任意の鎖長のオリゴグリコサミノグルカンを、高収率、高純度で製造する方法を提供することである。

【解決手段】 還元末端のグリコシル化に付する水酸基に脱離基が付与され、その他の水酸基及びカルボキシル基が保護されているグルクロン酸又はイズロン酸の誘導体を還元末端に持つ、糖供与体を、非還元末端のグリコシル化に付する水酸基がフリーであり、その他の水酸基が保護されているN-アシルガラクトサミン誘導体を還元末端に有する糖受容体と、特定のプロモーターの存在下でグリコシル化反応させる工程とする。

特願 2 0 0 4 - 0 9 3 2 1 9

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 2 8 1 9 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都豊島区高田 3 丁目 2 4 番 1 号

氏 名

大正製薬株式会社